

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-506360

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)7月21日

(51)Int.Cl. ^a	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 N 5/10			
A 61 K 35/12		7431-4C	
37/02	A D T	8314-4C	
		8412-4B	C 12 N 5/00
		9050-4B	15/00
			B
			A
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-509427
(86)(22)出願日 平成4年(1992)3月11日
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)9月10日
(86)国際出願番号 PCT/US92/01968
(87)国際公開番号 WO92/15323
(87)国際公開日 平成4年(1992)9月17日
(31)優先権主張番号 667, 274
(32)優先日 1991年3月11日
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, JP

(71)出願人 クリエイティブ バイオモレキュルズ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 01748 マサチューセッツ, ホブキンソン, サウス ストリート
35
(72)発明者 コーエン, チャールズ エム.
アメリカ合衆国 02053 マサチューセッツ, メドウェイ, ウィンスロップ ストリー
ト 98
(74)代理人 弁理士 犀野 清也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質により誘導される形態形成

(57)【要約】

1) 形態形成蛋白(モルフォゲン)を特徴づけるアミノ酸配列データ、構造面、ホモロジー性そして様々の他のデータ、2) 天然および組み換えソースからおよび合成構築物からこれら蛋白質を生産する方法、3) これらの形態形成蛋白と適切に修飾された組織、特異的なアトリックスから成る形態形成用具、4) 哺乳動物において非嵌合形成性組織の成長を誘導する用具、を開示する。

請求の範囲

1. 哺乳動物の中の始原細胞の数を増加させるための組成物であって、始原細胞群が刺激されて増殖するのに十分な濃度と時間で生体外でモルフォゲンにさらすことによって刺激された始原細胞群を含むもの。
2. 哺乳動物の中で非軟骨形成性組織の成長を誘導するための組成物であって、その始原細胞群が、生体内で組織の局所に置かれたとき、前記局所において、その非軟骨形成性組織に特異な分化および増殖ができるようにするために十分な濃度と時間モルフォゲンにさらすことによって刺激された始原細胞群を含むもの。
3. 請求項1または2の組成物であって、前記始原細胞群が造血性の多能性幹細胞群である組成物。
4. 請求項1または2の組成物であって、前記始原細胞群が間充細胞由来である組成物。
5. 哺乳動物の組織局所に非軟骨形成性の置換組織の形成を誘導するための組成物であって、前記組織に特異な成分を持ち、形態形成を許容する組織特異な環境を提供することができる、生体適合性のある非細胞のマトリックスと、前記マトリックス上に吸収されかつ置換組織を必要とする組織特異な局所に置かれたとき、前記局所に複数の発達段階をたどる組織形態形成を誘導することができるようなモルフォゲンを含むもの。
6. 哺乳動物の組織局所に非軟骨形成性の置換組織の形成を誘導するための組成物であって、形態形成を許容す

る組織特異な環境を提供することができる、生体適合性のある非細胞マトリックスと、前記マトリックス上に吸収させ、置換組織を必要とする組織特異の局所に与えたとき、前記局所に複数の発達段階をたどる組織形態形成を誘導することができるようなモルフォゲンを含むもの。

7. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが体内で分解され得るものである組成物。
8. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが器官特異の組織から作られたものである組成物。
9. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが、コラーゲンおよびグリコサミノグリカン類およびプロテオグリカン類からなるグループから選ばれる固着付着因子群を含むもの。
10. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが、前記哺乳動物の体からの移動してくる始原細胞群の侵入、分化および増殖を許容するに十分な寸法の孔を持つもの。
11. 請求項1、2、5または6の組成物であって、前記モルフォゲンが、hOP1 (Seq. ID No. 5)、mOP1 (Seq. ID No. 6)、hOP2 (Seq. ID No. 7)；mOP2 (Seq. ID No. 8)、CBMP2A (fx) (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (fx) (Seq. ID No. 10)、DPP (fx) (Seq. ID No. 11)、Vg1 (fx) (Seq. ID No. 12)、Vgr-1 (fx) (Seq. ID No. 13) およびGDP-1

(fx) (Seq. ID No. 14) からなるグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相同意があるアミノ酸配列を含むもの。

12. 請求項11の組成物であって、前記モルフォゲンが、前記グループから選ばれた配列の1つと少なくとも80%の相同意のあるアミノ酸配列を含むもの。
13. 請求項12の組成物であって、前記モルフォゲンがSeq. ID No. 5 (hOP1) の残基43-139の配列と60%よりも大きい同一性があるアミノ酸配列を含むもの。
14. 請求項13の組成物であって、前記モルフォゲンがSeq. ID No. 5 (hOP1) の残基43-139の配列と65%よりも大きい同一性があるアミノ酸配列を含むもの。
15. 始原細胞群の増殖を刺激するのに十分な濃度とある時間、始原細胞群をモルフォゲンと接触させるステップを含むことからなる、始原細胞群個体数を増加させる方法。
16. 哺乳動物内で始原細胞の数を増加させるための請求項15の方法であって、前記刺激された始原細胞群を、哺乳動物体内でその始原細胞の個体数を増加させるために、前記哺乳動物に入れるもう1つのステップを含む方法。
17. 哺乳動物の中で非軟骨形成性組織の成長を誘導するための方法であって、その始原細胞群が、生体内で組織特異な局所に置かれたとき、前記局所において、その

非軟骨形成性組織に特異な分化と増殖ができるようになるために十分な濃度と時間で、始原細胞をモルフォゲンに接触させるステップを含む方法。

18. 請求項14または16の方法であって、前記始原細胞群が間充細胞由来である方法。
19. 始原細胞群が刺激されてそれらの表現型を発現するのに十分な濃度と時間、始原細胞群をモルフォゲンと接触させるステップを含む、哺乳動物中の分化細胞群の表現型の発現を維持する方法。
20. 請求項19の方法であって、前記分化細胞群が老化性または静止性の細胞群である方法。
21. 哺乳動物の組織局所に非軟骨形成性組織成長を誘導するための方法であって、前記組織局所に、モルフォゲンを、該タンパク質が形態形成を許容する組織特異な局所に与えられたとき、前記局所に複数の発達段階をたどる組織形態形成を誘導することができるような濃度と時間、与えることを含む方法。
22. 請求項21の方法であって、前記非軟骨形成組織が肝組織であり、前記組織局所が肝臟である方法。
23. 請求項22の方法であって、前記プロテインが生体適合性のある非細胞性のマトリックスとともに前記局所に与えられる方法。
24. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが前記組織に特異性のある成分群を含むものである方法。
25. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが体内で分解され得るものである方法。

26. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが
新奇特異の組織から作られるものである方法。
27. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが
コラーゲンおよび前記組織に特異の細胞付着因子群を含む方法。
28. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが
前記哺乳動物の体から移動してくる始原細胞群の流入、
分化および増殖を許容する十分な寸法の孔を有する方法。
29. 請求項14、15、17または20の方法であって、前記モルフォゲンがhOP1(Seq. ID No.
5)、mOP1(Seq. ID No. 6)、hOP2
(Seq. ID No. 7)、mOP2(Seq. ID
No. 8)、CBMP2A(fx) (Seq. ID
No. 9)、CBMP2B(fx)(Seq. ID No.
10)、DPP(fx) (Seq. ID No. 11)、
Vgr1(fx) (Seq. ID No. 12)、Vgr1-
1(fx) (Seq. ID No. 13) およびGDF
F-1(fx) (Seq. ID No. 14)から成る
グループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の
相同意性が有するアミノ酸配列を含むものである方法。
30. 哺乳動物の肝臓の損傷組織局所に肝組織の形成を
誘導する方法であって、
少なくともhOP-1(Seq. ID No. 5)の
アミノ酸残基43-139を含むモルフォゲンの治療量
を前記局所に与えることを含む方法。
31. ヒトの組織の機能不全を判断するする方法であつ
ら選ばれたものである方法。

35. 非軟骨形成性の哺乳動物組織の成長の誘導に用い
る医薬品の製造に有用なモルフォゲン。
36. 始原細胞の増殖の誘導に用いる医薬品の製造に有
用なモルフォゲン。
37. 哺乳動物の分化細胞群の表現型発現の誘導に用い
る医薬品の製造に有用なモルフォゲン。
38. 肝組織の成長の誘導に用いる医薬品の製造に有用
なモルフォゲン。
39. 請求項35、36、37または38のモルフォゲンであ
って、hOP1(Seq. ID No. 5)、m
OP1(Seq. ID No. 6)、hOP2(Seq.
ID No. 7)、mOP2(Seq. ID No. 8)、
CBMP2A(fx) (Seq. ID No. 9)、C
BMP2B(fx) (Seq. ID No. 10)、D
PP(fx) (Seq. ID No. 11)、Vgr1
(fx) (Seq. ID No. 12)、Vgr1-1
(fx) (Seq. ID No. 13) およびGDF1
(fx) (Seq. ID No. 14)から成るグループか
ら選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相同意性を有
するアミノ酸配列を含むもの。
40. 請求項39のモルフォゲンであって、前記グル
ープから選ばれた配列の1つと少なくとも80%の相同意
性を有するアミノ酸配列を含むもの。
41. 疫病細胞の成長を抑止するための医薬品の製造に
有用なモルフォゲン。

て、次のステップ

(a) ヒトの中に存在する内在性の抗-モルフォゲン抗
体の濃度を検出するステップを、1つの時間間隔で繰り
返すこと、

(b) 前記検出された濃度を比較すること、検出された
濃度の変化が前記組織の状態を示す、
を含む方法。

32. 組織の状態を評価する方法であって、前記組織中
に存在するモルフォゲンの濃度を検出するステップを含
む方法。

33. 請求項32の方法であって、さらに

(a) 前記組織中に存在するモルフォゲンの濃度を検出
するステップを一定時間間隔で繰り返すこと、

(b) 前記検出された濃度を比較すること、前記検出さ
れた濃度の変化がその組織の状態を示す、
を含む方法。

34. 請求項33の方法であって、前記モルフォゲンが
hOP1(Seq. ID No. 5)；mOP1(Seq.
ID No. 6)；hOP2(Seq. ID No.
7)；mOP2(Seq. ID No. 8)；CBMP
2A(fx) (Seq. ID No. 9)；CBMP2
B(fx) (Seq. ID No. 10)；DPP(f
x) (Seq. ID No. 11)；Vgr1(fx)
(Seq. ID No. 12)；Vgr1-1(fx) (S
eq. ID No. 13)；およびGDF1(fx)
(Seq. ID No. 14)で構成されるグループか

42. モルフォゲンを含む免疫調節剤。

43. 組織の成長を誘導するための治療薬で、モルフォ
ゲンを含む治療薬。

44. 分化細胞群の表現型の発現を誘導するための治療
薬で、モルフォゲンを含む治療薬。

45. 始原細胞の増殖を誘導するための治療薬で、モル
フォゲンを含む治療薬。

明 碑 書

タンパク質により誘導される形態形成

発明の背景技術

この発明は、哺乳動物の体内で組織の形態形成を誘導する形態形成タンパク質、これらのタンパク質を同定する方法およびこれらのタンパク質を天然のソースから得る方法またはこれらのタンパク質の遺伝暗号を組み込んだ組換えDNAを発現させることによりこれらのタンパク質を生産する方法、組織特異性のある非構造マトリックスの作成、組織の安定状態の維持、修復および再生を促進する方法、およびこれらのタンパク質を用いて始原細胞集団を増大させる方法に関する。

細胞の分化は、形態形成の中心的な手段であり、胚に始まり、生物が生きている間ずっと、成体の組織の修復および再生メカニズムのなかでさまざまな程度に続く。成体の組織における形態形成の程度は組織によって異なり、とりわけその組織の細胞の代謝回転の程度に関係する。この点にもとづいて、組織は三つの大きなカテゴリに分類される：（1）細胞分裂が無くかつ初期の発生段階で形成された細胞の大部分が成体が生きている間ずっと生き続ける、神経や骨格筋のような停止細胞集団を含む組織、（2）一般的にはほとんど細胞分裂はしないが、適切な刺激に反応して細胞が分裂し同じ分化型の複数細胞を産み出す、肝臓のような、条件により再生する集

団を含む組織、（3）成体における速くかつ継続的な代謝回転を特徴とする、血液、精巢、皮膚扁平上皮を含む、一生の間再生する細胞集団を含む組織。このような組織では、最終分化細胞は比較的短かい寿命を持ち、幹細胞または始原細胞として知られる異なる細胞の増殖によって取って代られる。

これらの細胞の分化のための制御を調節する細胞および分子学者は、盛んに研究が行われている分野である。医学分野では、細胞の分化および組織の形態形成を制御する因子（因子類）の発見は、病気にかかったまたは損傷した哺乳動物の組織や器官を修復または再生する医療の能力を大いに発展させると期待される。特に疫に立つ分野には、再生外科や、関節炎、肺気腫、骨粗しょう症、心筋症、肝硬変、先天性神経症などの組織変性疾患の治療が含まれる。

近年、細胞分化に役割を果たすと見られる多数の異なる因子が単離された。これらの因子群のうちのいくつかは、ドロソフィラ（ショウジョウバエ）に確認されているN C T C H 遺伝子およびゼノブス（アフリカツメガエル）に確認されているそれと同様のX O T C H 遺伝子のような遺伝子転写活性化因子、それにケノラブディティス エレガンスに確認されている複数の転写活性化因子である。

遠近系は、その難航的に再生する細胞集団のために集中的な研究が行われている分野である。細胞の再生に関与している可能性のあるこの系で確認されている因子に

は、インターロイキン3（IL-3）、エリトロポエチン、CSF群（GM-CSF、G-CSF、M-CSFその他の）および多数の幹細胞成長因子がある。

細胞の分化に役割を果たすと考えられているその他のタンパク質には、インシクリン増成長因子（ICF）ファミリーのメンバであるタンパク質、ヘパリンに結合する成長因子ファミリーのメンバであるタンパク質群（例えば、PCGF-線性およびアルカリ性の線維芽細胞成長因子およびECDCGF-胎児性癌腫派生の成長因子）や、いくつかの胎児転換がん遺伝子（hoxおよびflkr-2、例えば、Health他（1990）、J. Cell Sci. Suppl. 10: 256-256参照）がある。細胞性粘着で確認されているOIF（分化誘導因子）は、その生体内に予め持っている細胞の分化を方向づけるもう1つの生体調節タンパク質である。

TGF-βスーパーファミリーのタンパク質と構造的に似ているタンパク質群も、種々の発生事象に関与すると確認されている。例えば、TGF-βやインヒビン/アクチビン グループのポリペプチドは、細胞の成長および分化を制御する働きをするらしい。MIS（ミュラー管抑制性物質）は、哺乳動物の雄性の発生中にミュラー管の退行を引き起こす。また、ドロソフィラ（ショウジョウバエ）のdecapentaplegic複合体の遺伝子産物であるDPPは、正しい骨-膜の分化に必要なものである。同様に、Vg-1はゼノブスの中胚葉の誘導に関与し、またVg-1は発生しつつあるマウス

の異なる組織中に確認されている。

多くの情報を明らかにするもう一つのソースは、骨の形態形成の分野である。骨のモデルシステムの開発と研究は、骨の分化の発達の段階が、間充細胞のケモタキシス（走化）、これらの始原細胞の増殖、これらの細胞の軟骨芽細胞への分化、軟骨の石灰化、血管の侵入、骨の形成、再成形、そして最後に骨髄の分化から成ることを確認した（Reddell（1981）Collagen

Reddell, Reddell, I: 209-206）。マトリックスと一緒にに入れられたとき哺乳動物の体内で軟骨内の骨形成を誘導する能力のあるタンパク質は、現在多数の異なる哺乳動物の種において確認されており、またこれらのタンパク質を遺伝暗号化している遺伝子も確認されている（例えば、米国特許No. 4,968,590および米国特許No. 5,011,691、Okkaynak他、（1990）EMBO J. 9: 2085-2093およびOkkaynak他、（1991）Bloch et al., Biophys. Res. Commun. 179: 116-123、および1992年2月21日出願のUSSN 07/841,645 参照）。これらのタンパク質は、相互にアミノ酸配列の相同意が高く、TGF-βスーパーファミリーのタンパク質の多数のメンバと構造が類似しており、適切に修饰されたマトリックスと一緒に哺乳動物に入れられたとき軟骨内骨形成および/または軟骨形成を誘導することが示されている。他の組織に、同じような複数発生段階の形態形成を誘導すること

ができるタンパク質は、まだ確認されていない。

本発明の一つの目的は、骨または軟骨とは異なる哺乳動物のいろいろな組織に、複数の発達段階をたどる形態形成を誘導することができる形態形成タンパク質類（“モルファゲン類”）およびこれらのタンパク質類を同定する方法を提供することである。この形態形成活性は、始原細胞の増殖および分化を誘導する能力と、成体の組織の形成に至る一連の事象を経て分化した表現型を支援し維持する能力を含む。もう一つの目的は、これらのタンパク質を遺伝暗号化している遺伝子、および組換えDNA技術を用いて天然のソースまたは合成ソースのどちらからでもこれらのタンパク質を発現させ単離する方法を提供することである。さらにもう一つの目的は、これらのタンパク質と組み合わせて使用できる組織特異性のある非細胞マトリックスを提供することである。その他の目的には、哺乳動物内で始原細胞集団を増大させる方法、生体内または試験管内で始原細胞を刺激して分化させそれらの細胞の分化した表現型を維持する方法、生体内で組織特異の成長を誘導する方法、および生体内の病気にかかったまたは損傷した組織を取り替える方法を提供することが含まれる。本発明のこれらのおよびその他の目的と特徴は、以下の説明、図および請求項から明らかになるであろう。

発明の要旨

本発明は、哺乳動物内で複数の発達段階をたどる組織

形態形成を誘導することができる形態形成タンパク質類（“モルファゲン類”）を提供する。特に、これらのタンパク質は、未分化の始原細胞の増殖を誘導することができ、そして適当な環境条件のもとで組織特異的にこれらの刺激された始原細胞の分化を誘導することができる。さらに、このモルファゲン類は、これらの分化した細胞の成長と維持を支援することができる。これらの形態形成活性は、この発明のタンパク質類が、形態形成を許容する環境において、複数の発達段階をたどる組織の形態形成を開始させかつ持続させること、すなわち組織特異的に幹細胞を刺激して増殖させ分化させて、新しい組織の形成で完結する一連の事象を誘導することを可能にする。これらの形態形成活性はまた、本発明のタンパク質類が、先にそれらの分化の道筋から外れるように誘導された細胞の“再分化”を刺激することも可能にする。適当な環境条件のもとでは、これらのモルファゲン類が、分化した細胞の“脱分化”を誘導することができるから知れないことが期待される（下記参照）。

本発明の1面において、本発明のタンパク質類および組成物は、哺乳動物内の病気にかかったまたは損傷した組織を取り替えるのに、とりわけ損傷した組織が正常な組織や器官の機能を妨げるときに、役に立つ。したがって、本発明のタンパク質類が、例えば、肺気道の結果傷んだ肺の組織、硬変した腎臓や肝臓の組織、心筋症および／または動脈血栓あるいは心臓塞栓による発作によって生じる得る心臓や血管の傷んだ組織、潰瘍性痔孔また

はその修復で傷んだ胃の組織、物理的な負傷またはアルツハイマー病や多発性硬化症や発作などの変性病で傷んだ神経組織、病氣や物理的な負傷の結果生じることがある歯牙質の組織、などの損傷した組織の修復に役立つことが期待される。本発明のタンパク質類が組織に特異な局所に与えられたとき、またはそれらの発現が組織に特異な局所において刺激されたとき、複数の発達段階をたどる組織形態形成が誘導される。その細胞内でモルファゲンの発現を刺激することができるタンパク質類または因子との接触により刺激された細胞を、組織の局所に与えててもよい。これらの場合には、そこに存在する組織が必要なマトリックスの条件を提供する。すなわち、形態形成が可能な環境において細胞を増殖させかつ分化させるための適切な培養基台を提供し、さらに発生しつつある組織の組織特異性を指示するために必要な信号鎖を提供する。あるいはまた、本発明のタンパク質類または刺激された細胞を、調整されたマトリックスと組み合わせて、生体内の局所にデバイスとして移植してもよい。この調整されたマトリックスは、生体適合性があり、軽ましくは体内分解性があり、後述される特徴を持つ、適正に修飾された、組織特異性のある非細胞マトリックスでなければならない。

多くの場合、組織の機能の喪失は、最初のまたは繰り返し受けた損傷に反応して形成されるはん度組織が原因となって生じる。はん度組織の形成の程度は、一般的には、損傷した組織の再生特性および損傷の程度と種類に

よって異なる。したがって、別の面において、本発明は、新たに損傷した組織の局所にモルファゲン類またはモルファゲンで刺激された細胞をつけることにより、はん度組織の形成を防止するかまたは殆んど完全に抑制するために使用できるかもしれないモルファゲン類も含む（下記参照）。

本発明のモルファゲン類はまた、哺乳動物において始原細胞または幹細胞の集団を増大または再生させるためにも使用できるであろう。例えば、始原細胞を個人の骨髄から単離し、体外でそれらの細胞を誘導して増殖させるのに十分な時間とモルファゲン濃度で刺激してから、骨髄に戻すことができる。適しているかもしれない他の始原細胞のソースには、培養された細胞の系統から取られ、培養中に刺激され、それから体内に入れられる、生体適合性のある細胞が含まれる。あるいはまた、モルファゲン類を、全身に投与するか、または埋め込み、注入、その他の方法により個人の体内で始原細胞集団に与えて、その始原細胞集団の分裂促進活性を誘導することもできるであろう。例えば、対象とする始原細胞集団においてモルファゲンの発現を刺激することができる因子を、例えば全身投与により、体内でその細胞群に与えて、分裂促進活性を誘発することができるであろう。同様に、本発明のモルファゲン類により、例えば、個人の血液を複数して対象とする細胞を抽出し、これらの細胞を体外で刺激し、刺激された細胞を血液に戻すことによって、造血幹細胞の数を増加させることができるであろう。個

特表平6-506360 (6)

人の治療細胞の数を増大させることができることの能力は、再生可能な細胞の消滅または数の減少から起きた非常にたいする現在の治療方法を著じるしく強力にするであろうと期待される。2つの特に重要な応用は、血栓疾患の治療と、感染したまたは失われた免疫細胞の治療である。その増殖を利用してできるからしない他の細胞集団は、皮膚組織の再生に使えるからしない表皮の幹細胞や、例えば腫瘍の治療に使えるかもしない胃腸内壁の幹細胞である。

本発明のさらにもう1つの面において、本発明のモルファゲン類はまた、既存の分化した細胞がそれらの表現型を発現し続けるように誘導することにより、分化細胞の成長と維持を支援するためにも使用できる。この活性は、骨粗しょう症において起こるように細胞が老化または停止することによって機能の喪失が引き起こされる組織の疾患において、特に役に立つことが期待される。これらの細胞を刺激してそれらの表現型を発現させそれによって機能障害の影響を翻案に遮断させ続けるためには、治療されるべき細胞に対する直接のこのタンパク質の使用または全身投与によるその投与が使用できるかもしれない（下記参照）。あるいはまた体内でモルファゲンの発現を刺激できる因子を投与してもよい。さらに、この発明のモルファゲン類はまた、遺伝子治療の計画において、静止した細胞の成長を刺激しそれによってこれらの細胞の外側のDNAを取り込む能力を潜在的に高めるためにも使用できるであろう。

比較することが可能になり、検出レベルの変化が組織の状態を示す。内在生のモルファゲンのレベルの変化はまた、モルファゲン類に対する体の自然の抗体力値の変化を検出することによって監視できる（下記参照）。

本発明の形態形成タンパク質類および組成物は、各種の天然に存在するソースから単離することもできるし、従来の組換えDNA技術を使って生合成により作ることもできる。同様に、マトリックス類は、器官特異の組織から説得することもできるし、後述するように合成によって調査することもできる。

これらの発展のかぎは、天然に存在する骨原性タンパク質類の発見と特徴の決定、および統一された注目すべき作用の観察であった。これらのタンパク質類は、もともと骨から単離され、適正に保存されたマトリックスとともに哺乳動物の体内に入れられたとき、血管形成、石灰化、および骨盤の分化を含む骨形成の全発達段階を説得することができる。この多段階発達を説得することができる天然のタンパク質類と、これらのタンパク質を遺伝暗号化しているDNA配列群は、複数の異なる種において単離され、特徴が決定されている（例えば、ヒトおよびマウスOP-1、OP-2、およびCBMP-2。

例えば、米国特許No. 4,958,590およびNo. 5,011,691; 1992年2月21日出願の米国特許出願No. 841,646; Sampath他（1990）J. Biol. Chem. 265: 13198-13205; Ozkaynak他（19

本発明のさらにもう1つの面において、本発明のモルファゲン類はまた、腫瘍形成中に起こり得るようにそれらの分化の道筋から外れてしまった細胞の“再分化”を誘導するためにも使用できるであろう。本発明のタンパク質類のこの活性は、新生物（腫瘍）の成長を遅くするかまたは実質的に禁止するための治療に特に役に立つであろうと期待されている。この方法はまた、またこれらの細胞の分化および再分化を誘導することも期待される。上述したように、これらのタンパク質類は細胞に直接にまたは全身投与により与えてもよい。また体内でモルファゲンの発現を刺激することができる因子を与えてよい。

最後に、内在生のモルファゲンのレベルの変化は、組織の機能不全を検出するための方法の一部として監視できるであろう。具体的には、内在生のモルファゲンレベルの変化は、組織あるいは器官の停止状態の変化を反映すると考えられる。組織の停止状態は、モルファゲン自身のレベルの変化を検出することによって監視できるであろう。例えば、組織のサンプルを一定時間間隔で採取し、その組織中に存在するモルファゲンの濃度を、この分野に習熟した人々に知られている標準的なタンパク質検査手段によって検出することができる。一例として、対象とするモルファゲンと特異的に相互作用し得る結合タンパク質、例えば抗モルファゲン抗体が、標準的な免疫検定において、モルファゲンを検出するために使用できる。それによって検出されたモルファゲンのレベルを

90) EMBO J. 9: 2085-2093およびOzakaynak他（1991）Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 116-123（参照）。これらのタンパク質類の成熟型は、特に成熟タンパク質のC-末端領域において、実質的なアミノ酸配列の相同意がある。特にこれらのタンパク質類は、この領域に、保存された6または7システインの骨格を持つ（例えば、C-末端のこれらのシステイン残基の直線配列は、他の明らかに必要なアミノ酸間に加えて、異なるタンパク質類に不可欠に保存されている（下記の表2参照））。

通常は骨や骨の形成に関係しないが、骨原性のタンパク質類のC-末端と殆ど完全なアミノ酸配列の相同意があり、6システインまたは7システインの保存骨格を含むポリペプチド鎖もまた、哺乳動物において骨を説得することができる事が確認されている。これらのポリペプチド鎖のなかには、ドロソフィラおよびゼノアスで確認されているアミノ酸配列群がある（例えば、DPPおよびV611-1; 例えば、米国特許No. 5,011,691および下記の表2参照）。さらに、これらの配列の相同意からの外側（構造）にもとづいて設計された、6または7システインの保存骨格を含む、非天然の生合成による構造は、適当なマトリックスとともに移植されたとき、哺乳動物類において軟骨内の骨形成を説得することが示されている（米国特許No. 5,011,691および下記の表3参照）。

特表平6-506360 (ア)

現在では、実質的に相同的なアミノ酸配列とまたは7システインの保存骨格を共通に持つこのタンパク質の“ファミリー”は、骨および軟骨に加えて、多種の他の器官や組織に対しても組織特異な形態形成を説明することができる真のモルフォゲン類であることが発見されている。このタンパク質類は、明らかに表面レセプターに結合するかまたは他の方法で始原細胞と接触し相互作用して、形態形成を許容する環境においてそれらの細胞に素因を与えるかまたは刺激して増殖させ分化させる。これらのモルフォゲン類は、自然に発生する組織によって必要とされる血管形成、結合組織の形成および神経の侵入などを含む、器官特異的な新しい組織の形成で完結する複数の発生段階をたどる細胞および分子事象を、説明することができる。

細胞の分化の仕方、例えばそれらが骨を作る骨芽細胞、造血細胞、または肝細胞のどれに分化するかは、それらの局所的な環境に依ることも発見されている（下記参照）。したがって、増殖し分化しつつある細胞は、その上に固定するための適した基台を必要とするに加えて、それらの組織特異性を方向づけるための適正な信号類をも必要とする。これらの信号類は、細胞の表面の標識の形を取ってらよい。

このモルフォゲン類（またはこれらのモルフォゲン類によって刺激された始原細胞群）が組織に特異な場所に与えられたとき（例えば、全身注入によるかまたは組織の特異な場所への埋め込みまたは注入によるか、さらに

は体内でモルフォゲンの発現を刺激することができる因子を投与することによる）、その場所の既存の組織は、病気にかかっていたり損傷したりしていても、適したマトリックスとして働く能力を持つ。あるいはまた、その損傷した組織がこうむっている痛みの程度がひどいときに必要であるかもしれないよう、刺激された始原細胞群またはモルフォゲンと一緒に調整したマトリックスを外部から与えることもできる。このマトリックスは、生体適合性があり、移動する始原細胞群の侵入、分化および増殖を許容する大きさを持つ適切に構造された非構造マトリックスであって、さらに形態形成を許容する環境を提供することができなければならない（下記参照）。このマトリックスは組織特異性がありかつ体内分解可能であることが好ましい。

調整マトリックスは、脱水された器官特異の組織から、例えばその組織を溶剤で処理してその組織からほとんど非構造要素を除去することにより作成できる。あるいはまた、このマトリックスは、生体適合性があり、好ましくは生体内で生物分解可能なコラーゲンのような構造高分子を、適当な組織特異性のある細胞付着因子と共に用いて、合成により調整することもできる。現在好ましい構造高分子は、組織特異なコラーゲンを要素として含む。現在好ましい細胞付着因子には、グリコスアミノグリカン類およびプロテオグリカン類などがある。このマトリックスはさらに、その哺乳動物の体内から移動する始原細胞群の侵入、増殖および分化を促進するように、表面

の細孔や微小なくぼみの数を増加させるために、一つまたは複数の薬品で処理してもよい。

この発明において役に立つタンパク質類には、OP-1、OP-2、CBMP-2タンパク質のような当初骨原性のタンパク質類として確認されたタンパク質類や、DPP（ドロソフィラ由来）、Vg-1（ゼノブース由来）、Vgr-1（マウス由来、変2およびSeq. ID No. 5-14参照）などのアミノ酸配列が確認したタンパク質、および近年確認されたGDF-1タンパク質（Seq. ID No. 14）がある。このファミリーのメンバー—TGF-βスーパーファミリーのタンパク質を含む—は、それらのC-末端領域に、実質的に相同的なアミノ酸配列を共通に持っている。下記の表1は、現在までに確認されている多数のモルフォゲン類を、この明細書で使用している名前と配列識別番号と共に示す。

表 1

OP-1 OP-1タンパク質を遺伝暗号化しているDNA配列の1部分または全体から発現される形態形成にたいして活性なタンパク質のグループを全般的に指し、その対立変異および種間変異、例えば、ヒトのOP-1（“hOP-1” Seq. ID No. 5、成熟タンパク質のアミノ酸配列）またはマウスのOP-1（“mOP-1” Seq.

9、ID No. 6、成熟タンパク質のアミノ酸配列）も含む。7システインの保存骨格は、Seq. ID No. 5および5の残基38から139によって構成されている。このタンパク質類の全長を暗号化しているcDNA配列およびアミノ酸は、Seq. ID No. 16および17（hOP-1）およびSeq. ID No. 18および19（mOP-1）で与えられる。成熟タンパク質は、残基293-431（hOP-1）および292-430（mOP-1）によって構成される。このタンパク質類の、切断されると成熟した形態形成活性なタンパク質を生じる”proto”領域は、実質的に、アミノ酸残基30-292（hOP-1）およびアミノ酸残基30-291（mOP-1）によって構成されている。

OP-2 OP-2タンパク質を遺伝暗号化しているDNA配列の1部分または全体から発現される活性なタンパク質のグループを全般的に指し、その対立変異および種間変異、例えば、ヒトのOP-2（“hOP-2” Seq. ID No. 7、成熟タンパク質のアミノ酸配列）またはマウスのOP-2（“mOP-2” Seq. ID No. 8、成熟タンパク質のアミノ酸配列）も含む。

特表平6-506360 (8)

7システィンの保存骨格は、Seq. ID No. 7および8の残基38から139によって構成されている。このタンパク質鎖の全長を暗号化しているcDNA配列およびアミノ酸は、Seq. ID No. 20および21(hOP2)およびSeq. ID No. 22および23(mOP2)に示されている。成熟タンパク質鎖は、実質的にアミノ酸残基264-402(hOP2)および261-399(mOP2)によって構成されている。このタンパク質鎖の、切断されると成熟した形態形成活性なタンパク質を生じる"pro"領域は、実質的に、アミノ酸残基18-253(hOP2)およびアミノ酸残基18-260(mOP1)によって構成されている。	コード化されており、7システィンの保存骨格(Seq. ID No. 11)を構成するタンパク質配列群を指す。
CBMP2	Vg1 (fx) ゼノブスのVg1遺伝子でコード化されており、7システィンの保存骨格(Seq. ID No. 12)を構成するタンパク質配列群を指す。
DPP (fx) ドロソフィラのDPP遺伝子によって	Vgr-1 (fx) ネズミのVgr-1遺伝子でコード化されており、7システィンの保存骨格(Seq. ID No. 13)を構成するタンパク質配列群を指す。
CBMP2タンパク質鎖をコード化しているDNA配列から発現された形態形成活性なタンパク質のグループを全体的に指し、その対立変異および種間変異、例えば、ヒトのCBMP2A("CBMP2A(fx)"、Seq. ID No. 9)またはヒトのCBMP2B DNA ("CBMP2B(fx)"、Seq. ID No. 10)も含む。	GDF-1 (fx) ヒトのGDF-1遺伝子でコード化されており、7システィンの保存骨格(Seq. ID No. 14)を構成するタンパク質配列群を指す。

けている。

これらのモルフォゲン類は、還元されたときは不活性であるが、酸化された同一2量体のときおよび本発明の他のモルフォゲン類と組み合わせて酸化されたときは活性である。すなわち、ここに説明しているように、本発明のモルフォゲンは、一对のポリペプチド鎖からなる2量体のタンパク質であり、各ポリペプチド鎖は、少なくとも、Seq. ID No. 5のアミノ酸残基43-139によって構成されるC-末端の6システィン骨格——これらのシスティンの機能的に同等な配列(例えば、配列中のシスティンの直線配列は異なるが、折りたたまつ構造中のシスティンの関係は見えないようなアミノ酸の付加や欠落があるもの)を含む——を持つ。そのため、これらのポリペプチド鎖が折りたたまつとき、このポリペプチド鎖の対からなる2量体タンパク質鎖は、ここで説明されているようなモルフォゲンの働きをすることができる神経の膜内または膜間のジスルフィド結合を含む、特有の3次元構造をとる。具体的には、このタンパク質は、形態形成を許容する環境において、次のような生物学的作用：始原細胞の増殖を制御すること、始原細胞の分化を制御すること、分化した細胞の増殖を制御すること、および分化した細胞の成長と維持を支援すること、さらにはこれらの細胞の再分化も含む、のすべてが可能である。さらに本発明のモルフォゲン類は、適当な環境条件のもとで、分化した細胞の既分化を诱导できるであろうことも期待される。

OP-2タンパク質鎖は、このファミリの他のタンパク質鎖に共通して存在する保存されたシスティン骨格に加えて、この領域にもう1つのシスティン残基を持つ(例えば、Seq. ID No. 7および8の残基41を参照)。GDF-1タンパク質は、保存骨格の中に、4つのアミノ酸からなる挿入部を持つ(Seq. ID No. 14の残基44-47)。しかしこの挿入部は、折りたたまつ構造中のシスティンの関係には影響を及ぼさないように見える。さらに、CBMP2タンパク質鎖には、システィン骨格中の1つのアミノ酸残基が欠

けている面においては、本発明のモルフォゲン類は、各X₀₋₃が20の天然のL-異性体のα-アミノ酸類の1つまたはそれらの1つの構造体を指す、包括的に表示した2種類のアミノ酸配列：一般配列1(Seq. ID No. 1)または一般配列2(Seq. ID No. 2)の1つ含む。一般配列1は、6システィンの保存骨格を含み、一般配列2は6システィンの保存骨格に加えてOP-2で確認されている追加のシスティンを含む(Seq. ID No. 2の残基36参照)。もう1つの好ましい面においては、これらの配列はさらに、それらのN-末端に次の追加の配列を含む。

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa (Seq. ID No. 15)

1 S

上記の一般配列のうちの好ましいアミノ酸配列には、一般配列3(Seq. ID No. 3)および一般配列4(Seq. ID No. 4)が含まれる。これらの一般配列は、今までに確認されているこのモルフォゲンファミリの多数の好ましいメンバの間に共通する相異性(表2参照)と、それらのメンバの間のアミノ酸配列の変異を収容している。一般配列3と4は、表2に示されておりまたSeq. ID No. 5-14で決められているタンパク質の複合アミノ酸配列である。これらの一般配列3と4は、表2の配列群が共通に持つアミノ酸配列の第一部と、その配列内の変更可能な位置にたいして

特表平6-506360 (9)

選択し得る残基の両方を示している。これらの一般配列は、一般配列3の位置4-1または一般配列の位置4-5に、分子間または分子内のジスルフィド結合が可能な特有のシステイン骨格を提供しながら、もう1つのシステインを含むことができること、およびこのタンパク質の三次構造に影響を及ぼす幾つかの重要なアミノ酸群を含んでいることに注目されたい。

一般配列3

Xaa Tyr Val Xaa Phe	
1	5
Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa	
10	
Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala	
15	20
Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa	
25	30
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
35	
Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa	
40	45
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
50	
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys	
55	60

Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	
65	
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa	
70	75
Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa	
80	
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa	
85	90
Xaa Cys Gly Cys Xaa	
95	

ただし、Xaa は次のように決められた1または複数の指定されたアミノ酸から独立に選ばれる。“res.” は“残基”を示す。

Xaa res.4-(Ser, Asp または Glu);
 Xaa res.6-(Arg, Gln, Ser または Lys);
 Xaa res.7-(Asp または Glu);
 Xaa res.8-(Leu または Val);
 Xaa res.11-(Gln, Leu, Asp, His または Asn);
 Xaa res.12-(Asp, Arg または Ile);
 Xaa res.14-(Ile または Val);
 Xaa res.15-(Ile または Val);
 Xaa res.18-(Glu, Gln, Leu, Lys, Pro または Arg);
 Xaa res.20-(Tyr または Phe);
 Xaa res.21-(Ala, Ser, Asp, Met, His, Leu または Glu);

Xaa res.23-(Tyr, Asn または Phe);
 Xaa res.26-(Glu, His, Tyr, Asp または Gln);
 Xaa res.28-(Glu, Lys, Asp または Gln);
 Xaa res.30-(Ile, Ser, Pro または Gln);
 Xaa res.31-(Phe, Leu または Tyr);
 Xaa res.33-(Leu または Val);
 Xaa res.34-(Asn, Asp, Ala または Thr);
 Xaa res.35-(Ser, Asp, Glu, Leu または Ala);
 Xaa res.36-(Tyr, Cys, His, Ser または Ile);
 Xaa res.37-(Met, Phe, Gly または Leu);
 Xaa res.38-(Asn または Ser);
 Xaa res.39-(Ala, Ser または Gly);
 Xaa res.40-(Thr, Leu または Ser);
 Xaa res.44-(Ile または Val);
 Xaa res.45-(Val または Leu);
 Xaa res.46-(Gln または Arg);
 Xaa res.47-(Thr, Ala または Ser);
 Xaa res.49-(Val または Met);
 Xaa res.50-(His または Asn);
 Xaa res.51-(Phe, Leu, Asn, Ser, Ala または Val);
 Xaa res.52-(Ile, Met, Asn, Ala または Val);
 Xaa res.53-(Asn, Lys, Ala または Glu);
 Xaa res.54-(Pro または Ser);
 Xaa res.55-(Glu, Asp, Asn または Gly);
 Xaa res.56-(Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser または Ala);

Xaa res.57-(Val, Ala または Ile);
 Xaa res.58-(Pro または Asp);
 Xaa res.59-(Lys または Leu);
 Xaa res.60-(Pro または Ala);
 Xaa res.63-(Ala または Val);
 Xaa res.65-(Thr または Ala);
 Xaa res.66-(Gln, Lys, Arg または Gln);
 Xaa res.67-(Leu, Met または Val);
 Xaa res.68-(Asn, Ser または Asp);
 Xaa res.69-(Ala, Pro または Ser);
 Xaa res.70-(Ile, Thr または Val);
 Xaa res.71-(Ser または Ala);
 Xaa res.72-(Val または Met);
 Xaa res.74-(Tyr または Phe);
 Xaa res.75-(Phe, Tyr または Leu);
 Xaa res.76-(Asp または Asn);
 Xaa res.77-(Asp, Glu, Asn または Ser);
 Xaa res.78-(Ser, Gln, Asn または Tyr);
 Xaa res.79-(Ser, Asn, Asp または Glu);
 Xaa res.80-(Asn, Thr または Lys);
 Xaa res.82-(Ile または Val);
 Xaa res.84-(Lys または Arg);
 Xaa res.85-(Lys, Asn, Gln または Glu);
 Xaa res.86-(Tyr または Ile);
 Xaa res.87-(Asn, Gln または Glu);
 Xaa res.88-(Asn, Glu または Asp);

Xaa res.90-(Val, Thr または Ala);
 Xaa res.92-(Arg, Lys, Val, Asp または Glu);
 Xaa res.93-(Ala, Gly または Glu);
 および Xaa res.97-(His または Arg)

また一般配列 4 は、

一般配列 4

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Lys	Tyr	Val	Xaa	Phe
1	5	10								
Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Trp	Xaa	Xaa	Trp	Xaa		
15										
Xaa	Ala	Pro	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Ala			
20		25								
Xaa	Tyr	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa			
30		35								
Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa				
40										
Xaa	Xaa	Xaa	Aan	Bis	Ala	Xaa	Xaa			
45		50								
Xaa										
55										
Xaa	Cys									
60		65								
Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		

Xaa	Xaa	Xaa	Lys	Xaa	Xaa	Xaa
70						
75						
Xaa	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Xaa
80						
85						
Xaa						
90						
95						
Xaa	Cys	Gly	Cys	Xaa		
100						

ただし、Xaa は次のように決められた 1 または複数の指定されたアミノ酸から独立に選ばれる。“res.” は “残基” を示す。

Xaa res.2-(Lys または Arg);
 Xaa res.3-(Lys または Arg);
 Xaa res.4-(His または Arg);
 Xaa res.5-(Glu, Ser, His, Gly, Arg または Pro);
 Xaa res.9-(Ser, Asp または Glu);
 Xaa res.11-(Arg, Glu, Ser または Lys);
 Xaa res.12-(Asp または Glu);
 Xaa res.13-(Leu または Val);
 Xaa res.16-(Glu, Leu, Asp, His または Aan);
 Xaa res.17-(Asp, Arg または Asn);
 Xaa res.19-(Ile または Val);
 Xaa res.20-(Ile または Val);
 Xaa res.23-(Glu, Gin, Leu, Lys, Pro または Arg);

Xaa res.25-(Tyr または Phe);
 Xaa res.26-(Ala, Ser, Asp, Met, His, Leu または Glu);
 Xaa res.28-(Tyr, Aan または Phe);
 Xaa res.31-(Glu, His, Tyr, Asp または Glu);
 Xaa res.33-Glu, Lys, Arg または Glu);
 Xaa res.35-(Ala, Ser または Pro);
 Xaa res.36-(Phe, Leu または Tyr);
 Xaa res.38-(Leu または Val);
 Xaa res.39-(Aan, Asp, Ala または Thr);
 Xaa res.40-(Ser, Asp, Glu, Leu または Ala);
 Xaa res.41-(Tyr, Cys, His, Ser または Ile);
 Xaa res.42-(Met, Phe, Gly または Leu);
 Xaa res.44-(Ala, Ser または Gly);
 Xaa res.45-(Thr, Leu または Ser);
 Xaa res.49-(Ile または Val);
 Xaa res.50-(Val または Leu);
 Xaa res.51-(Glu または Arg);
 Xaa res.52-(Thr, Ala または Ser);
 Xaa res.54-(Val または Met);
 Xaa res.55-(His または Asn);
 Xaa res.56-(Phe, Leu, Aan, Ser, Ala または Val);
 Xaa res.57-(Ile, Met, Aan, Ala または Val);
 Xaa res.58-(Asp, Lys, Ala または Glu);
 Xaa res.59-(Pro または Ser);
 Xaa res.60-(Glu, Asp または Gly);

Xaa res.61-(Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser または Ala);
 Xaa res.62-(Val, Ala または Ile);
 Xaa res.63-(Pro または Asp);
 Xaa res.64-(Lys または Leu);
 Xaa res.65-(Pro または Ala);
 Xaa res.68-(Ala または Val);
 Xaa res.70-(Thr または Ala);
 Xaa res.71-(Gin, Lys, Arg または Glu);
 Xaa res.72-(Leu, Met または Val);
 Xaa res.73-(Aan, Ser または Asp);
 Xaa res.74-(Ala, Pro または Ser);
 Xaa res.75-(Ile, Thr または Val);
 Xaa res.76-(Ser または Ala);
 Xaa res.77-(Val または Met);
 Xaa res.79-(Tyr または Phe);
 Xaa res.80-(Phe, Tyr または Leu);
 Xaa res.81-(Asp または Asn);
 Xaa res.82-(Asp, Glu, Aan または Ser);
 Xaa res.83-(Ser, Glu, Aan または Tyr);
 Xaa res.84-(Ser, Aan, Asp または Glu);
 Xaa res.85-(Aan, Thr または Lys);
 Xaa res.87-(Ile または Val);
 Xaa res.89-(Lys または Arg);
 Xaa res.90-(Lys, Aan, Glu または His);
 Xaa res.91-(Tyr または His);

特表平6-506360 (11)

Xaa res. 92-(Arg, Glu または Glu);
Xaa res. 93-(Asn, Glu または Asp);
Xaa res. 95-(Val, Thr または Ala);
Xaa res. 97-(Arg, Lys, Val, Asp または Glu);
Xaa res. 98-(Ala, Gly または Glu);
および Xaa res. 102-(Bis または Ars).

本発明においてモルフォゲンとして使用するのに特に有効な配列群は、少なくとも 6 または 7 システインの保存骨格を含む C - 末端領域、例えば V₆I, V₆R-I, DPP, OP-I, OP-2, CBMP-2A, CBMP-2B および CDF-I の C - 末端の 96 - 102 のアミノ酸残基 (下記の表 2 および Seq. ID No. 5 - 14 参照)、を含むものである。さらに一段配列から設計された生合成による構造、例えば COP-1, 3 - 5, 7, 15 (下記の表 3 参照) もまた有効である。他の配列群は、C - 末端に CBMP-3 およびインヒビン / アクチビン タンパク質 (例えば米国特許 No. 4, 968, 590 および 5, 011, 691 参照) を含む。したがって、他の有効な配列群は、上記の配列群のどれかと、少なくとも 70 % のアミノ酸配列の相異性、好ましくは 30 % の相異性があるものである。これらの配列には、対立異形および複雑異形および突然変異形、生合成によるムテイン類、およびこの形態形成タンパク質のファミリの新しいメンバなどが含まれることが期待される。この図録のタンパク質のファミリのなかでは、形態形成

活性を示し、かつ好み配列からのアミノ酸の変化が保存的な変化を含むタンパク質類、例えば、Day of I 価によって、Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, Suppl. 3, pp. 345 - 362 (M. O. Dayhoff 編, Nat'l Biomed. Research Found., Washington, D. C. 1979) に説明されているようなタンパク質類が、特には目される。

本発明におけるモルフォゲンとして有効な、現在最も好みタンパク質配列群には、hOP-1 の 6 システインの保存骨格を構成するアミノ酸の配列 (例えば, Seq. ID No. 5 の残基 43 - 139) と 60 % より大きい、好みは 65 % より大きい同一性を持つタンパク質配列が含まれる。これらの最も好み配列群には、OP-1 および OP-2 タンパク質の対立異形および種間異形も含まれる。

本発明はこのように、天然に存在するソースから単離されたものであるか、組換え DNA 技術によって作られたものであるかによらず、上記したポリペプチド類のどれかを含むタンパク質類を提供する。またこれらのタンパク質類の対立異形および種間異形、天然に発生するまたは生合成された変異形、および端が切り取られたまたは合着した多数の構造も含む。欠落または付加による変異形 — 保存された C - 末端のシスティン骨格を変えるかもしれない変異形も、その変化が折りたたまつ構造

中のこれらのシスティンの関係を乱して機能を失わせるものでなければ含まれる — 一もまた、活性があると考えられる (下記参照)。したがって、このような活性のある形は、ここに開示された図録に記述された構造と同等のものであると見なされる。これらのタンパク質類には、異なるグリコシル化パターンを持つ形、異なる N - 末端を持つ形、アミノ酸配列が相同的な領域を持つ複数のタンパク質のファミリ、および天然のタンパク質類またはホスト細胞内で組換え DNA の発現によって作られた生合成タンパク質類の端が切り取られたまたは変異した形であって活性なものが含まれる。

この形態形成タンパク質類は、完全なまたは端が切り取られた cDNA から、または原核または真核のホスト細胞内で合成 DNA から発現させ、複製し、切断し、再び折りたたまらせ、二量体重合させることにより、形態形成にたいして活性な構造を形成させることもできる。現在好まれているホスト細胞群には、大腸菌または CHOK, COS, BSC 細胞のような哺乳動物の細胞が含まれる。

したがって、この開示を参考にして、熟練した遺伝子工学技術者は、cDNA からまたは適宜なアミノ酸配列を暗号化している多数の異なる種のゲノムライブラリから遺伝子を単離するか、またはオリゴヌクレオチド群から DNA を構成して、それらを原核および真核の両方を含むいろいろな種類のホスト細胞内で発現させて、ヒトを含む多種の哺乳動物の体内で組織特異的細胞の分化お

よび組織の形態形成を誘導することができる活性なタンパク質類を大量に生産することができる。

本発明はしたがってさらに、本発明の形態形成タンパク質類を用いて組織特異的形態形成を誘導するこれらの方法、および本発明のモルフォゲン類を含む商品および治療薬も包括する。本発明はさらに、組織の成長を誘導するための処置、培養細胞の増殖を誘導するための処置、新生物の成長を抑制するための処置、および分化した細胞の表現型細胞発現を促進するための処置を含む、いろいろな医療装置のための医薬の製造にこれらのモルフォゲンを使用することも含む。

図面の簡単な説明

本発明それ自体、および本発明の前述した目的やその他の目的および特徴は、添付の図面と一緒に読むとき、以下の説明図からより良く理解されるであろう。

図 1 は、成熟マウスのいろいろな組織における V₆I - 1 特異な転写体を同定する Northern Blot 法による陽性像写真である。

図 2 は、2週齢のマウス群から用意されたいいろいろなマウスの組織 (パネル A) および 5 週齢のマウス群から用意されたいいろいろなマウスの組織 (パネル B) における mOP-1 特異な mRNA の発現を確認する Northern Blot 法による陽性像写真である。

図 3 は、(1) 17 日胎児群および (2) 出生後 3 日のマウス群における E^Y-T_U (A, 対照)、mOP-

特表平6-506360 (12)

I (B, D)、および Vgr-1 (C) の mRNA の発現を確認する Northern Blot 法による顕微鏡写真である。

図 4 A および 4 B は、大鼠皮膚 (A) および骨髓 (B) 内の OP-1 の存在を (免疫蛍光染色によって) 示す顕微鏡写真である。

図 5 A および 5 B は、未分化の NG : 08 細胞 (5 A) を誘導して神経の形態の分化 (5 B) をおこさせることができるものと示されたモルフォゲン (OP-1) の効果を示す顕微鏡写真である。

図 6 A - 6 D は、ヒトの胎児の筋肉細胞の再分化にたいするモルフォゲン (OP-1) の効果を示す顕微鏡写真である。

図 7 は、部分的に肝臓を切除したラット群にたいする食塩加リソ酸緩衝液 (PBS、動物 1) またはモルフォゲン (OP-1、動物 2) の効果を示す顕微鏡写真である。

図 8 A - 8 C は、象牙質の再生にたいする無治療 (8 A)、キャリヤーマトリックス治療 (8 B) およびモルフォゲン治療 (OP-1、8 C) の効果を示す顕微鏡写真である。

発明の開示

哺乳動物の骨から得られたタンパク質抽出物の中に存在する骨形成 (骨を誘導する) タンパク質の単離を可能にする精製手順が、最初に開発された (PCT US 89

/01453 および米国特許 No. 968, 590 参照)。この方法の開発は、新鮮な子ウシの骨が入手可能であることと結びついて、実質的に純粋なウシの骨形成タンパク質 (BOP) の単離を可能にした。BOP はその基本事項が調べられ、次にネコ、ウサギ、ラットにおいて軟骨そして最終的に軟骨内の骨の成長を誘導する能力があることが示され、研究された。さらに、それ以前には異成分から成る骨抽出物の中の未知の 1 つまたは複数のタンパク質によるものと考えられていた骨の形成の全発達段階を説明できることが示された。さらにこの用意に依存しかつ非常に特異性のある活性は、このタンパク質がグリコシル化されているかいないかによらず存在した (米国特許 No. 4, 968, 958、1988 年 8 月 4 日出願および Sampath 他 (1990) J. Biol. Chem. 265: pp. 13198-13205 参照)。ウシの材料から得られた配列のデータは、異なる種から得られた骨形成タンパク質を追跡暗号化している遺伝子序を単離するために使用されたプローブのデザインに示唆を与えた。ヒトおよびネズミの骨形成性タンパク質の同種物は、すでに確認された基本項目が調べられた (例えば、米国特許 No. 5, 011, 691, Ozkaynak 他 (1990) EMBO J 9: 2085-2093、および Ozkaynak 他 (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 116-123、および USSN 341, 646、1992 年 2 月 21 日出願を

参照。それらの開示は、参照によりここの組み入れられている。)

ウシの材料から得られた配列データはまた、骨形成に役割を果していることが知られていないこの分野において既知の多数のタンパク質との大きな相同意性を示唆した。これらのタンパク質類を用いた骨形成の実験は、これらのタンパク質類を過量のマトリックスと一緒に哺乳動物を入れたとき、軟骨および軟骨内の骨の形成が誘導されることを示した (例えば、米国特許 No. 5, 011, 691 参照)。これらのタンパク質類のうちの 1 つは、背-腹の分化に役割を果たすことが知られておりかつ成虫芽の正しい形態形成に必要とされるドロソフィラのタンパク質 DPP である。他の 2 つのタンパク質は、ゼノブスおよびマウスにおいて確認された類似の配列 (それぞれ Vgr-1 および Vgr-1) であり、胚形成期の成長と分化の制御に役割を果たすと考えられている。DPP および Vgr-1 (または Vgr-1 に類似物質) の転写体は、いろいろな組織 (胚、新生児および成体、Lyons 他 (1989) PNAS 86: 4554-4558、および下記参考) で確認されているが、母系遺伝しかつ空間的に植物内胚葉に限定されている Vgr-1 の転写体は、原腸胚形成後は劇的に減少する。

これらの相同意性から、マトリックスと一緒に入れられたとき哺乳動物内で骨の形態形成を誘導するために必要な活性な配列を含む、包括的な共通の配列が導き出された。この一般配列は、少なくとも、保存された 5 システ

インの骨格 (一般配列 1、Seq. ID No. 1)、または任意の 7 システイン骨格 (一般配列 2、Seq. ID No. 2) を持つ。この 7 システイン骨格は、一般配列 1 で決められる 6 システインの保存骨格と、残基 36 の位置のもう 1 つのシステインを含み、OP-2 タンパク質において確認されている付加的なシステイン残基を収容する。一般配列の中の各 "Xaa" は、その位置に、天然の 20 の L- 異性体の α- アミノ酸の 1 つまたはその 1 つの誘導体を入れてもよいことを示す。もっと長いやはり有効な一般配列は、さらに、それらの N- 末端に次の配列を含む。

Cys Ile Xaa Xaa Xaa Xaa (Seq. ID No. 15)

1 5

この包括的な共通の配列から設計され合成された構造も、軟骨および/または軟骨内の骨形成を誘導することが示されている (例えば、米国特許 No. 5, 011, 691 に記載されており、かつ下記の表 3 に示した COP-1, COCP-3, COP-4, COP-5, COP-7 および COP-16)。下記の表 2 は、モルフォゲンとして確認されている天然のタンパク質類の活性領域のアミノ酸配列を比較している。このようなタンパク質には、ヒト OP-1 (hOP-1, Seq. ID No. 5 および 16-17)、マウス OP-1 (mOP-1, Seq. ID No. 5 および 18-19)、

特表平6-506360 (13)

表 2

ヒトおよびマウスOP-2 (Seq. ID No. 7, Bおよび20-22)、CBMP2A (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (Seq. ID No. 10)、DPP (ドロソフィラ由来、Seq. ID No. 11)、Vg1 (ゼノアブ由来、Seq. ID No. 12)、Vgr-1 (マウス由来、Seq. ID No. 13) およびGDF-1 (Seq. ID No. 14) が含まれる。この表の中の3つのドットは、その位置のアミノ酸が、hOP-1のアミノ酸と同じであることを示している。3つのダッシュは、その位置にはアミノ酸が存在しないことを示しており、相間性を明らかにする目的で入れてある。例えば、CBMP-2AおよびCBMP-2Bの残基60の位置のアミノ酸は欠落している。もちろん、これらの2つのアミノ酸配列は、この領域において、Asn-Ser (残基58, 59) の次に、CBMP-2AはLysおよびIleを含み、CBMP-2BはSerおよびIleを含む。

hOP-1	Cys	Lys	Lys	Bis	Gly	Leu	Tyr	Val	
eOP-1	
bOP-2	...	Arg	Arg	
eOP-2	...	Arg	Arg	
DPP	...	Arg	Arg	...	Ser	
Vg1	Lys	Arg	Bis	
Vgr-1	Gly	
CBMP-2A	Arg	...	Pro	
CBMP-2B	...	Arg	Arg	...	Ser	
GDF-1	...	Arg	Ala	Arg	Arg	
	1					5			
hOP-1	Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Itp	Gln	Asp
eOP-1
bOP-2	Gln	Leu	...
eOP-2	Ser	Leu	...
DPP	Asp	...	Ser	...	Val	Asp	...
Vg1	Glu	...	Lys	...	Val	Asn
Vgr-1	Gln	...	Val
CBMP-2A	Asp	...	Ser	...	Val	Asn	...
CBMP-2B	Asp	...	Ser	...	Val	Asn	...
GDF-1	Glu	Val	Bis	Arg
	10						15		

hOP-1	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala
eOP-1
bOP-2	...	Val	Glo	Ser	
eOP-2	...	Val	Glo	Ser	
DPP	Val	...	Leu	Asp	
Vg1	...	Val	Glo	Asp	
Vgr-1	Glo	
CBMP-2A	Val	...	Pro	Ala	
CBMP-2B	Val	...	Pro	Gln	
GDF-1	...	Val	Arg	...	Phe	Leu	
	20					25			
hOP-2	Asp	...	Cys
eOP-2	Asp	...	Cys
bOP-2	Ala	Asp	His	Phe
eOP-2	Ala	Asp	His	Phe
DPP	Ala	Asp	His	Phe
Vg1	Ala	Asp	His	Phe
Vgr-1	Ala	Asp	His	Phe
CBMP-2A	Ala	Asp	His	Phe
CBMP-2B	Ala	Asp	His	Phe
GDF-1	Ala	Asp	His	Phe
	40								
hOP-1	Thr	Asn	Bis	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu
eOP-1
bOP-2	Leu	...	Ser	...
eOP-2	Leu	...	Ser	...
DPP	Leu
Vg1	Ser	Leu
Vgr-1	Leu
CBMP-2A	Leu
CBMP-2B	Leu
GDF-1	Leu	Val	Leu	Arg	Ala
	45						50		
hOP-1	Val	Bis	Phe	Ile	Asn	Pro	Glo	Thr	Val
eOP-1	Asp
bOP-2	...	Bis	Leu	Met	Lys	...	Asn	Ala	...
eOP-2	...	Bis	Leu	Met	Lys	...	Asp	Val	...

特表平6-506360 (14)

DPP	... Ile Asn Asn Gly Lys ...	DPP	... Asp Ser Val Ala Met Leu
Vgl Ser ... Glu Asp Ile	CBMP-2A	... Ser Met Leu
Vgr-1 Val Met Tyr ...	CBMP-2B	... Ser Met Leu
CBMP-2A	... Asn Ser Val ... Ser ... Lys Ile	GDF-1	... Ser Pro Phe ...
CBMP-2B	... Asn Ser Val ... Ser ... Ser Ile		75 80
GDF-1	Met ... Ala Ala Ala ... Gly Ala Ala	bOP-1	Asp Arg Ser Ser Asn V
	55 60	aOP-1	Ile Leu Lys
bOP-1	Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu	bOP-2	... Ser ... Asn Arg
mOP-1	mOP-2	... Ser ... Asn Arg
bOP-2 Ala Lys	DPP	Asn ... Glu ... Thr ... Val ...
mOP-2 Ala Lys	Vgl	... Asn Asn Asp Val ... Arg
DPP Ala Val	Vgr-1 Asn
Vgl	... Leu Val Lys	CBMP-2A	... Glu Asn Glu Lys ... Val ...
Vgr-1 Lys	CBMP-2B	... Glu Tyr Asp Lys ... Val ...
CBMP-2A Ala Val Glu	GDF-1	... Asn ... Asp Val ... Arg
CBMP-2B Ala Val Glu		85
GDF-1	Asp Leu Val ... Ala Arg	bOP-1	Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg
	55 70	aOP-1
bOP-1	Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe	bOP-2	... His Lys
mOP-1	mOP-2	... His Lys
bOP-2	... Ser ... Thr Tyr	DPP	Asn ... Glu Glu ... Thr ... Val
mOP-2	... Ser ... Thr Tyr	Vgl	His ... Glu Ala ... Asp
Vgl	Met Ser Pro Met ... Phe Tyr	Vgr-1
Vgr-1	Val	CBMP-2A	Asn ... Glu Asp Glu

CBMP-2B	Asn ... Glu Glu Glu
GDF-1	Gln ... Glu Asp Asp
	90 95
bOP-1	Ala Cys Gly Cys His
mOP-1
bOP-2
mOP-2
DPP	Gly Arg
Vgl	Glu Arg
Vgr-1
CBMP-2A	Gly Arg
CBMP-2B	Gly Arg
GDF-1	Glu Arg
	100
** GDF-1 の残基 43 と 44 の間には、アミノ酸配列 Gly-Gly-Pro-Pro が入っている。	

下記の表 3 は、COP-1, 3, 4, 5, 7, 16 と名づけた 6 つの類似の生合成された構造のアミノ酸配列のデータの比較を示す。これらの配列はまた、米国特許 N. S. 0 1 1, 691 にも記載されている。表 2 におけるのと同じように、ドットはその位置に COP-1 のアミノ酸と同じアミノ酸があることを示し、ダッシュは COP-1 のアミノ酸がその位置では欠落していることを示す。

表 3

COP-1	Leu Tyr Val Asp Phe Glu Arg Asp Val
COP-3
COP-4 Ser
COP-5 Ser
COP-7 Ser
COP-16 Ser
	1 5
COP-1	Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala
COP-3 Val ...
COP-4 Val ...
COP-5 Val ...
COP-7 Asn Val ...
COP-16 Asn Val ...
	10 15
COP-1	Pro Val Asp Phe Asp Ala Tyr Tyr
COP-3	... Pro Gly Tyr Glu ... Phe ...
COP-4	... Pro Gly Tyr Glu ... Phe ...
COP-5	... Pro Gly Tyr Glu ... Phe ...
COP-7	... Pro Gly Tyr His ... Phe ...
COP-16	... Pro Gly Tyr Glu ... Phe ...
	20 25

持表平6-506360 (16)

COP-1	Cys	Ser	Gly	Ala	Cys	Glu	Phe	Pro		COP-4
COP-3	COP-5	...	Ser	Val	...	Ser	Lys	Ile	...
COP-4	COP-7	...	Ser	Val	...	Ser	Lys	Ile	...
COP-5	...	His	...	Glu	...	Pro	COP-16	...	Ser	Val	...	Ser	Lys	Ile	...
COP-7	...	His	...	Glu	...	Pro								55	
COP-16	...	His	...	Glu	...	Pro									
					30													
COP-1	Ser	Ala	Asp	His	Phe	Asn	Ser	Thr		COP-1	Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Thr
COP-3	COP-4
COP-4	COP-5	Ala
COP-5	Leu	COP-7	Ala
COP-7	Leu	Leu	COP-16	Ala
COP-16	Leu								65	
					35													
							40											
COP-1	Asn	His	Ala	Val	Val	Glu	Thr	Leu	Val	COP-1	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser	Met	Leu
COP-3	COP-4
COP-4	COP-5
COP-5	COP-7
COP-7	COP-16
COP-16								70	
					45													
							50											
COP-1	Asn	Asn	Met	Asn	Pro	Gly	Lys	Val		COP-1	Tyr	Leu	Asp	Glu	Asn	Ser	Thr	Val
COP-3	COP-4	Glu	Lys	...
COP-4	COP-5	Glu	Lys	...

COP-7	Glu	Lys	...
COP-15	Glu	Lys	...
	75					80		
COP-1	Val	Leu	Lys	Ser	Tyr	Gl		
n	Glu	Met						
COP-3
COP-4
COP-5
COP-7
COP-16
			85					90
COP-1	Thr	Val	Val	Gly	Cys	Gl		
r	Cys	Arg						
COP-3	Val	...	Glu
COP-4	Val	...	Glu
COP-5	Val	...	Glu
COP-7	Val	...	Glu
COP-16	Val	...	Glu
						95		

前述のアミノ酸配列の比較から明らかのように、モルフォゲン活性を保持しながら、これらの一級配列の内部でかなりのアミノ酸の変更が可能である。例えば、図2に図示されているGDF-1タンパク質の配列は、同図に示されているhOP1の配列と、約50%のアミノ酸しか同じでないが、GDF-1の配列は、hOP1配列と、70%よりも大きいアミノ酸配列の相同意性を持つ。ここで、相同意性は、Atlas of protein Sequence and Structure: vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-362 (M. O. Dayhoff, ed., Nat'l Bio Med. Res. Found., Washington, D. C. 1979)においてDayhoff 他によって定義されているように、その配列内で許容される保存的なアミノ酸の変更であると定義する。

これらの配列によって示されるタンパク質のファミリーはまた、骨および軟骨以外の組織においても、組織特異的な多段階発生を開始させ維持することができることが発見されている。ここに開示したような未分化の始原細胞と組み合せたとき、モルフォゲン類と名づけたこれらのタンパク質群は、その始原細胞の増殖と分化を誘導することができる。これらの細胞の分化を方向づける適当な組織特異性信号が存在し、かつ形態形成を許容する環境において、これらのモルフォゲン類は、胚の発生期に起こる多段階の細胞および分子事象を再現して、複雑な組織を生じさせることができる。

これらの発展のかぎは、哺乳動物の組織のモデルシステム、すなわち軟骨内の骨形成にたいするモデルシステムの創出と、骨の組織の形成形成のために重要な多段階の事象の研究であった。このシステムを使った研究は、骨を誘導するモルファゲン類だけでなく、組織を誘導するモルファゲン類とそれらの活性の発見を可視化にした。骨のモデルシステムを開発するために使われた方法は、現在ではこの分野においてよく知られているが、本発明のタンパク質類と組み合わせると、他の組織、例えば肝臓のためのモデルシステムを作り出すために使用できる（下記参照）。

軟骨内の骨形成のモデルシステムを使って、組織の形成形成にたいしては、形態形成する材料が置かれる局所的な環境が重要であることも発見されている。ここでの使用では、「局所環境」は、組織の構造マトリックスとその組織をとりまく環境を含むと解釈される。例えば、モルファゲンにより刺激された細胞は、それらの増殖のために適当な栄養基を必要とするだけでなく、それらの分化の組織特異性を指示するための信号類を必要とする。これらの信号は異なる組織にたいしては異なるおり、細胞の表面の認識も含まれる。さらに、新しい組織の血管形成は、血管形成を支持する局所環境を必要とする。例として骨のモデルシステムを使うことにより、標準的な試験条件下では、骨誘導性のモルファゲン類を組織の特異性を指定するマトリックスが存在しない、バラバラの間充満に入れると、非常に高濃度のタンパク質を

入れないかぎり、普通には軟骨内骨形成はおこらない。対的に、比較的低濃度のモルファゲンを適正に修飾された骨由来のマトリックスと一緒に入れると、完全に機能する軟骨内骨が形成される（例えば、Sampath他（1981）PNAS 78：1599-1603および米国特許No. 4,915,526参照）。さらに、組織特異なコラーゲンのような構造ポリマーと、組織特異なグリコシルアミノグリカンのような組織特異の糖鎖付着因子群とから構成された合成マトリックスは、軟骨内の骨形成を可能にするであろう（例えば、PCT公報 US91/03603、1991年12月12日発行（WO91/18558）——参照によりここに組み入れられている 参照）。最後に、モルファゲンと骨または軟骨にたいして特異性のある適当なマトリックス（例えば、タイプ1軟骨を含むもの）と一緒にバラバラの間充満に移植すると、軟骨および軟骨内骨形成がおこり、骨盤および血管システムまで形成される。しかしながら、同じ組成を血管を含まない環境、例えば試験管内の培養細胞群や軟骨に特異な部位に置くと、組織の発達は軟骨の形成から先へは続かない（下記参照）。同様に、タイプ2のコラーゲンから構成される軟骨特異なマトリックスを含むモルファゲン組成物は、生体内で非軟骨組織（例えば、ヒアリン）の形成を誘導することが報告される。しかしながら、この組成物を血管を支持している環境例えばバラバラの間充満に置くと、この組成物は、増殖しつつある胎原細胞群を誘導して軟骨細胞および道

骨細胞へ分化させ、最終的には骨を形成させることができる。

また組織の形態形成は、形態形成を許容する環境を必要とすることも発見されている。明らかに、一生の間再生を続ける細胞集団から構成されていない、完全に機能している健康な組織では、機能的な組織の成長を阻止する信号類が存在するはずである。したがって、細胞の成長や分化を制御する、フィードバック制御機構のような、制御機構が存在するにちがいないと考えられている。実験、TCF-BおよびMISは、両方とも、適当な濃度で存在するとき、細胞の成長を阻止することができるこれが知られている。さらに、骨のモデルシステムを使って、異次しさにグアニジン抽出して実質的に完全に非コラーゲンタンパク質類を除去した骨由来のキャラ（マトリックス）を含む骨形成デバイスは、骨誘導性のモルファゲンと一緒に移植すると、軟骨内骨形成を許すことを示すことができる。しかしながら、骨由来のキャラを脱炭せず、例えば低濃度の塩の中で洗浄するだけにすると、軟骨内の骨形成の誘導は抑制される。このことは、そのキャラの中に、1つまたは複数の抑制因子があることを示唆している。

これらの発展のもう1つのぎは、発達しつつある組織および成体組織におけるこれらのモルファゲン類の広範な分布の決定であった。例えば、OPPは胚胎および発達しつつあるドロソフィラの組織で発現されている。Vg1の転写体は、ゼノブースの胚胎の組織の中に確認さ

れている。Vg1-1の転写体は、胚胎および発達しつつある筋、肺、肝臓、腎臓および頭蓋冠（皮膚骨）の組織を含むネズミのいろいろな組織で確認されている。近年、Vg1-1転写体は、成長したネズミの筋、腎臓、心臓および筋でも確認され、特に筋の中に多いことが確認された（下記参照）。

OP-1およびCBMP2タンパク質は、最初は骨モルファゲン類として確認されたものであり、組織から作成されたcDNAライブラリの中のOP-1およびCBMP2に特異な配列を固定することにより確認されたところによれば、マウスおよびヒトの胎盤、筋肉、頭蓋冠および骨肉腫の組織中に確認されている（Ozkanら他（1990）EMBO J 9:2085-2093およびOzkan等他（1991）Biochem. Biophys. Res. Commun. 179:116-123 参照）。さらに、OP-1タンパク質は、Western Blot分析および免疫位置決定法により確認されたところによれば、腎臓、肝臓、心臓、副腎臓、筋を含む各種の胚胎類および発達期の組織中に存在する（下記参照）。OP-1特異の転写体もまた、胚胎期および発達期の組織の両方で、そして腎臓、膀胱および筋において最も多く、確認されている（下記参照）。OP-1はまた、胚形成期に、中葉胚を誘導する因子として存在することも確認されている（下記参照）。さらにOP-1は、仔細胞群の中でそれらと関係し、また成長したネズミの軟骨内骨の損傷の後

特表平6-506360 (17)

に骨髄中の多能性細胞と関係することが示されたが、このことは組織の修復ならびに再生におけるOP-1の形態形成上の役割を示している。さらに近年確認されたタンパク質GDP-1(表2参照)は、神経組織の中で確認された(Lees, (1991) PNAS 88 4255-4254)。

四

モルフォゲンの同定と実験

本発明において既に立つタンパク質類のなかには、当初骨髄部タンパク質として確認されたタンパク質がある。例えばOP-1、OP-2、CBMPタンパク質や、アミノ酸配列が類似するDPP(ドコソフィラ由来)、Vg1(ゼノアス由来)、Vgr-1(マウス由来、表2および配列リスト参照)のようなタンパク質である。このファミリのメンバー構造的に類似するタンパク質のTGF- β スーパーファミリのいくつかのメンバーを含むーは、それらのC-末端領域に実質的なアミノ酸配列の相同意がある。OP-2タンパク質類は、このファミリの他のタンパク質類と共に保存システィン骨格に加えて、この領域に1つの余分のシスティン残基(配列番号No. 1および8の位置41)を持つ。これらのタンパク質類は、還元されたときは不活性であるが、酸化された同一2量体複合群のとき、および他のモルフォゲン類と組み合わせて酸化されたときは活性である。

前述のアミノ酸およびDNA配列に関する情報、当業界の技術水準、および米国特許No.s. 4,966,590および5,011,691、PCT出願US89/01469、公開1989年10月19日(WO89/09788)、およびOzkanaynak他(1991)EMBO J 9:2085-2093およびOzkanaynak他(1991)Biochem. Biophys. Res. Commn. 179:116-123ー開示内容は参照によってここに組み入れられているーが与えられているので、少なくとも本発明の一つのモルフォゲンの活性領域、その多様な類似構造(対立変異や、遺伝子工学により作られた変異形を含むする変異種も含む)、さらには融合タンパク質類、成熟タンパク質類の端が切り取られたもの、欠損や付加による変異形、およびそれらに類似な構造、などを暗号化する多様なDNAが構成できる。さらに、DNAのハイブリッド化のためのプローブ類は、これらのタンパク質類のどれかを暗号化している遺伝子の断片ーこれらのタンパク質の活性領域またはpr.領域を暗号化している配列を含むもの(下記参照)ーから構成することもできるし、一般配列から新規に設計することもできる。これらのプローブは、異なるゲノムおよびcDNAライブラリをスクリーニングして、異なる組織からさらに別の形態形成タンパク質を同定するために使用できる。

このようなDNAは、この分野に習熟した者によって、ゲノムおよびcDNAの単離、合成オリゴスクレオチド

したがって、本発明のモルフォゲン類は、各X_aが20の天然のレーキ性体のローラミノ酸類の1つまたはそれらの1つの説導体を指す、包括的に表示した2種類のアミノ酸配列: 一般配列1または一般配列2(Seq. ID No. 1および2)のどちらかによって記述される。このタンパク質のファミリに入る特に有効な配列群には、Vg1、Vgr-1、DPP、OP-1、OP-2、CBMP-2A、CBMP-2B、GDF-1の96-102のC末端残基と、それらの完全な成熟アミノ酸配列群がある。さらに、これら的一般配列から設計された生合成構造、例えば、COP-1、COP-3-5、COP-7およびCOP-16などもまた有効である(例えば、米国特許No. 5,011,691参照)。

現在までにモルフォゲン類として使用できることが確認されている配列から選択された好みのアミノ酸配列を示す一般配列は、一般配列3(Seq. ID No. 3)および一般配列4(Seq. ID No. 4)によって記述される。これらの一般配列群は、分子間または分子内のジスルフィド結合が形成可能な7または8システインの骨格を持つこと、およびそれらのタンパク質類の三次構造に影響を及ぼす幾つかの重要なアミノ酸残基を含んでいることに注目されたい。天然に存在するタンパク質類の異なるN-末端群は、これらのタンパク質類の組織特異性、または他の重要な調節活性を与えていることも考えられている。

からの合成DNAの構成、カセット突然変異誘発技術などを含むよく知られたDNA操作技術を使って、作ることができる。Biosearchの8600型DNA合成器により15-100merのオリゴスクレオチドを合成し、トリス-ホウ酸塩-EDTA緩衝液中でポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により精製する。この後、DNAはゲルから電気的に溶離される。オーバーラップしたオリゴマーは、T4ポリスクレオチドキナーゼにより磷酸化して、PAGEによっても精製し得るより大きなブロックに結合する。

次に適正に固定されたクローンからのDNAが単離され、サブクローン化され(好みのベクターの中に)、そして配列決定される。対象とする配列群を含んだプラスミド群は、次に、モルフォゲンを発現させるためおよびさらには性質を調べるために、適当なホスト細胞に移入される。ホスト細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよい。なぜなら、前者はタンパク質をグリコシル化する能力がないので、そのタンパク質の形態形成活性を損なわないからである。便利な宿主細胞群としては、大腸菌、サッカロミセス、昆蟲/バクロウイルス系のシステム、ミエローマ細胞、および多數の他の哺乳動物の細胞がある。このベクターはさらに、転写アロモーター、終止配列、エンハンサー(増強構造)、好みのリボソーム結合部位配列、好みのmRNAリーダー配列、タンパク質の分離のための信号配列などを含む、組換えタンパク質の正しい発現を促進するためのいろいろな配列を

含むことができる。

対象とする遺伝子を暗号化したDNA配列はまた、抑制配列であるかもしれない配列を除去するため、あるいは望ましくない二次および三次構造の形成を最小にするよう操作される。この組換えモルファゲンもまた融合タンパク質として発現される。翻訳後、タンパク質に細胞自体から糖鎖するか、培養液から回収される。生物学的に活性なすべてのタンパク質の形は、ジスルフィドボンドによって結合されているか、または他の方法で結合した二量体種群を含む。これらは一つまたはそれ以上のいろいろな組換えポリペプチド鎖を、適当な原核細胞内または試験管内で、個々のサブユニット群を発現させた後に、リボールディングおよび酸化させて作られる。大規模および多数の異なる哺乳動物細胞の中で組換えDNAから発現されたモルファゲン類に関する詳細な記述は、PCT公報US90/05903、1991年5月2日(WO91/05802)公開および米国特許権No. 841,646、1992年2月21日出願——この開示内容は参照によりここに組み入れられている——に開示されている。

また別のやり方として、形態形成ポリペプチド鎖を、この分野において通常の技術者にもよく知られている從来のペプチド合成技術を用いて、化学的に合成することも可能である。例えば、Biosynthesisの固体相ペプチド合成器で、標準の操作手順を用いて、完全なタンパク質あるいは部分的なタンパク質を合成することができます。

ある。完成した種はつぎに保護をはずされ、HPLC(高压液体クロマトグラフィ)によって精製される。もしもそのタンパク質が部分的に合度されたものであるときは、それらの部分を、標準的な手法を用いてペプチド結合させて、完全なタンパク質を形成することができる。一般的には、モルファゲン類の作り方は従来の方法でよく、これは本発明の一部分を構成するものではない。

モルファゲンの分布

本発明のモルファゲン類の、生物の全生命期間を通じての一般的な確認は、全く異なる各種の哺乳動物の組織における発現から証明できる。モルファゲン類の組織分布の決定もまた、与えられた組織で発現される異なるモルファゲン類を同定したり、新しい、類似したモルファゲン類を同定するのにも利用できる。このタンパク質類(あるいはそのmRNA転写体群)は、標準的な手法または発現が少ない組織においてはそれを僅かに修正した方法を使って、異なった組織中において簡単に確認できる。例えば、タンパク質分布は、標準のWestern Blot分析法または免疫萤光技術と、対象とするモルファゲンまたはモルファゲン類に特異な抗体群を用いて、決定することができる。同じように、モルファゲン転写体の分布は、標準のNorthernハイブリッド化アロトコルおよび転写体に特異なプローブ類を用いて決定できる。

特異的に1つの転写体とのハイブリッド化が可能で、

対象とする転写体を他の類似する転写体から区別できるものであれば、どのようなプローブでも使用できる。本発明のモルファゲン類は、それらの活性なC-末端領域に高い相容性があるので、特定のモルファゲン転写体の組織分布は、不成熟タンパク質のpro領域および/または成熟タンパク質のN-末端領域にたいして特異的なプローブを使用すると、最もよく決定できるであろう。その使用できる配列は、停止コドンに隣接しつつそれに続く3' 非暗号領域である。配列中のこれらの部分は、本発明のモルファゲン類の間で大幅に異なり、したがって各タンパク質に特有のものである。例えば、特に有効なV8r-1特異のプローブ配列は、PvuII-SacIフラグメント、すなわち翻訳されないpro領域の1部分と成熟配列のN-末端の両方を暗号化している2.65kbのフラグメントである(cDNA配列の記述は、Lyons社(1989)PNAS 86:4554-4558参照)。同様に、特に有効なmOP-1特異のプローブ配列群は、Bal31-BglIフラグメント、すなわちmOP-1のpro領域のほぼ2/3を含む0.68kbの配列: SstI-SstIフラグメントすなわち7システイン領域のすぐ上流の0.2kbの配列: およびBsrI-PstIフラグメント、すなわち3' 非翻訳配列の1部分を含むり、3kbのフラグメントである(Seq. ID No. 18 参照、この配列では、pro領域は本質的に残る30-291で規定されている)。例えばmOP1(Seq. ID

No. 16)またはヒトまたはマウスのOP2(Seq. ID No. 20および22)に対しても、同様のアプローチが使用できる。

これらのモルファゲン特異なプローブ類一一合成されたものでも、クローン化された配列から得られたものでもよい——を使うと、この分野の皆の技術を持つ人々によく知られている標準的な方法によって、哺乳動物の組織中のモルファゲン転写体を確認できる。簡単に説明すると、成長したネズミのいろいろな組織(例えば、肝臓、腎臓、精巣、心臓、脳、胸腺および腎)から、標準的な方法、例えばChomczynski他の方針((1987)Anal. Biochem. 162:156-159)で、下記のようにして、全RNAを用意する。オリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィ(例えば、Pharmacia LKB Biotechne 1000社のタイプ7)を使って、ポリ(A)+RNAを用意する。各組織からのポリ(A)+RNA(通常15μg)を、1%のアガロース/フェルムアルデヒドゲル上で分別し、Nytran膜(Schleicher & Schuell)の上に移す。移した後、そのメンブレンを80°Cで焼き、紫外光線(通常1mW/cm²で30秒間)のもとでRNAを架橋させる。ハイブリッド化の前に、適当なプローブ(例えば、PvuII-SacI-V8r-1フラグメント)を加熱して変性させる。ハイブリッド化は、ローラーボトル装置内ではほぼ1回転/分で回転するルーサイト型のシリンドラの中で、

特表平6-506360 (19)

4.0% ファルムアルデヒド、5×Denhardt's、5×SSPE および 0.1% SDS からなるハイブリッド化ミックスを使って、37℃で約15時間行う。このハイブリッド化の後、非特異のものは、0.1×SSPE、0.1% SDS 中で 50°C でフィルタ洗浄して除かれる。成熟配列の異なる N 末端にたいして特異性のある Vgr-1 プローブを使って行った Northern Blots 分析は、Vgr-1 のメッセージが約 3.5 kb であることを示す。

図1は、Vgr-1 特異のプローブを用いて、成長したネズミのいろいろな組織を、Northern Blots 分析で調べた結果を表す。頭微鏡写真である：レーン 3-10 はそれぞれ肝臓、腎臓、精巢、心臓、脳、盲腸および腎を示している。レーン 1 と 12 はサイズスタンダードであり、レーン 2 と 11 はブランクである。テストした組織の中で、Vgr-1 が最も多く発現されていたのは成人の肺であり、少なかったのは成人の腎臓、心臓および脳であった。これらの結果は Vgr-1 および Vgr-1 相転写体をいくつかの成熟マウス組織で確認した以前の研究成果、(Shionoら、(1989) PNAS 86: 4554-4558)、ならびに、いろいろなヒト cDNA ライブラリ組の中で OP-1 および CBMP2 を確認した研究成果（例えば、胎盤、海馬、頭蓋骨、および骨肉腫組織、Ozakaynakら、(1990) EMBO J: 2085-2093 参照）を確認し発展せるものである。

に対して行われた追加の分析は示されていないが、OP-1 の mRNA 発現は高く、腎臓/副腎組織で検知されたレベルに近かった。Northern Blots 分析によれば、GDF-1、OP-1 mRNA 発現は異なった組織においても同じように bicistronic であることも示されている。異なった組織において、4つの転写体：4 kb、2.4 kb、2.2 kb、および 1.8 kb の転写体が確認され、OP-1 特異のプローブを用いて、遺伝子の p_{ro} 部分と N-末端配列群をクロスアローブ検査した結果、これらの転写体は OP-1 特異のものであることが示された。

図3の OP-1 および Vgr-1 の並列比較によって、これらのプローブが異なる組織中のモルフォゲン Vgr-1 と OP-1 転写体を区別することがわかり、また異なる組織中の OP-1 の複数の転写体を擇かび上がらせることが示されている。具体的には、図3は OP-1 (バネル B および D)、Vgr-1 (バネル C)、および EF-Tu (バネル A) (対照) 胎性 17 日 (レーン 1) および生後 3 日 (レーン 2) のマウスの mRNA の発現を比較したものである。OP-1 特異 (バネル B および D)、Vgr-1 特異 (バネル C)、および EF-Tu 特異 (バネル A) のラベルつき DNA プローブによる連続ハイブリッド化には同じフィルタが使われた。バネル A：EF-Tu 特異のプローブ (対照) は 0.4 kb の Hind III-Sac I フラグメント (サンプル質を暗号する領域の一部) であり、使われた Sac I サ

同じプローブ検査方法を使って、図2および3に示すように、OP-1 転写体も多くのネズミ組織の芽頭およびいろいろな成長組織の中で確認されている。プローブ検査方法の詳細は Ozkaynakら、(1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 179: 115-123 に開示されており、ここにレファレンスとして収録されている。図2に示されている Northern Blots は、生後 13 日のマウス (バネル A) または 5 週令のマウス (バネル B) の成長中の脳、肺臓、肺、腎臓 (および副腎)、心臓、および肝臓からの RNA をプローブ検査したものである。この OP-1 特異のプローブは上記の 3' 非翻訳配列群を含んだもの (0.34 kb Bari I-Pst I フラグメント) であった。RNA 回収のための対照として、EF-Tu (翻訳伸長因子) mRNA 発現も測定された (EF-Tu 発現はほとんどの組織で比較的均一と思われる)。

矢じり君は、種々の組織で検索される OP-1 特異のメッセージ群を示している。図2で明らかのように、OP-1 発現は、肺臓、肺、腎臓および副腎組織で大幅に異なるが、これらの EF-Tu mRNA レベルは一定である。心臓、脳、および肝臓で、一様に低い EF-Tu mRNA レベルが観察された。頭微鏡写真に明らかに見られるように、最も高いレベルの OP-1 mRNA は腎臓および副腎、ついで脳に現れる。反対に、心臓および肝臓からは検知できる信号はなかった。膀胱組織

イトはベクターに属する；バネル B：OP-1 特異のプローブは 0.68 kb の Bari I-Bgl II フラグメントで p_{ro} 部分配列群を含むもの；バネル D：OP-1 特異のプローブは 0.34 kb の Bari I-Pst I フラグメントで 3' 非翻訳配列を含むもの；バネル C：Vgr-1 特異のプローブは 0.26 kb の Pvu II-Sac I フラグメントで上記の Vgr-1 の分析で使われたものである。

1.8-2.5 kb の OP-1 mRNA は、生後 3 日のマウスでは胎性 17 日のものに比べて約 2 倍高く発現するが、これは多分骨および/または腎臓の成長の様相を反映しているものであろう。さらに、脳で認められた 4 つのメッセージ群では、2.2 kb の転写体が最も多く現れたが、肺と肺臓では 1.8 kb のメッセージが支配的であった。5 週令マウスの腎臓および副腎組織を性差なく分離した結果、2.2 kb 転写体は腎臓組織から出るが、4 kb mRNA は副腎により多いことが判明した (図2 参照)。

同様に、同じ一般的なプローブ検査方法を使用して、BMP3 および CBMP2B 転写群が肺組織に大量にあることが最近確認された。

胎性組織中のモルフォゲン分布は、5ないし 6 日令のマウス胎児群ならびにモルフォゲン特異の抗血清と組み合わせた標準的な免疫蛍光分析手法を用いることによって決定することができる。例えば、ウサギの抗 OP-1 抗血清は、当書界で広く知られている多くの標準抗体ア

コトコル類のいずれかを使用すれば簡単に得ることができる。次にこの抗体に標準的な手法を用いて蛍光ラベルをつける。次に、5ないし6日令のマウス胎児を薄い切片に切り分け、ラベル付けされた抗体で各種の成長組織群を再び標準的な手法を使って検査する。こうした手法を使って、成長中の脳および心臓の中にOP-1タンパク質が検出された。

この方法は複数中の成人組織群の中のモルファゲン環を確認するのにも使用できるであろう。例えば、ウサギの長骨例えば大脛骨に骨折部分を作る。2ないし3日、骨折が治るように放置しておく。その後、そのウサギを屠殺し、骨折部分を細かく切り分け、モルファゲン、例えばOP-1、の存在を確認するため検査する。この検査には標準の免疫位置分析方法を利用し、蛍光ラベルを付けたウサギ抗OP-1抗体液を使用する。この手法によって、付隨筋細胞群中のOP-1ならびに、筋肉、軟骨、および軟骨内骨の成長のために始原細胞群を確認する。さらに、OP-1は骨膜中に潜在する多能性幹細胞群でも確認され、それが組織の修復および再生における形態形成の役割を果たしていることが示された。

OP-1タンパク質はラットの脳の中でも、標準の免疫蛍光着色手法を用いて確認された。具体的には、成熟ラット脳(2-3月令)および脊髄を摘出し、切片に細分した。ウサギで養成し、標準的な方法によってOP-1アフィニティカラム上で精製した抗-OP-1を、これらの切片群に特定の結合をさせるために標準的な条件

下で加えた。次に、OP-1抗体が組織の切片に結合しているのを観察できるように、蛍光ラベルを付したヤギの抗-ウサギIgGを使用した。

図4Aおよび4Bに見られるように、免疫蛍光着色によってOP-1が成熟ラットの中権神経系(CNS)に存在することがわかる。同様の、より広範な着色が図(4A)および脊髄(4B)の双方に認められる。OP-1は主として灰白質の細胞外マトリックスに局在し、ニューロン細胞群を除くすべてのエリアに存在する。白質部分では、着色は星状神経膠細胞群に限られている。同様の着色パターンは新生ラット(10日令)の脳の切片中にも認められる。

細胞の分化

本発明のモルファゲン環の細胞分化能力は、若い間充細胞群をモルファゲンの存在下で培養し、培養した細胞群をトルイジンブルーで着色し、その細胞を組織学的に研究することによって確定することができる。例えば、下頸骨に成長することになっているラットの間充細胞群を、ステージ11で、上にかぶさっている上皮細胞から切り離し標準的な組織培養条件で試験管で培養すると、分化は確認しない。しかしながら同じ細胞群をあと1日、上にかぶさっている内胚葉に接触したままにしておくと、この時にはステージ12の細胞群になっているが、これらの細胞群は試験管内でも軟骨細胞群を形成するよう分化を続ける。さらに追骨細胞群への分化、そして最終的に、下頸骨に分化するためには適当な局所環境、例えば血管形成の環境、が必要である。

モルファゲン、例えばOP-1、の存在下で試験管内で培養されたステージ11の間充細胞群は、試験管内で軟骨細胞群を形成するように分化をし続けることがすでに発見されている。これらのステージ11細胞群はまた、もし上を覆っている内胚葉細胞群から取り出された胚盤生物群とともに試験管内で培養されれば、試験管内で分化をし続ける。そのうえ、OP-1は、内胚葉細胞群で調整された媒体の中に、Western Blot法または免疫蛍光法のいずれかで確認することができる。この実験は、異なるモルファゲン環の細胞分化能力を評価したり、異なる成長組織群でのそれらの分布を

調べるために、その他のモルファゲン環ならびに異なる間充細胞群を使って行うことができる。

モルファゲン誘導の細胞分化のもう一つの例として、神経芽細胞群の分化に対するOP-1の効果が培養でテストされた。具体的には、NG108-15の神経芽細胞×神經膠細胞ハイブリッド細胞系統に対するOP-1の効果の評価が行われた。この細胞系統は培養中、神経芽細胞的な形態形成を示した。この細胞系統は、0.5 mMのブチレート、1%のDMSOまたは5.00 mMのフェルスコリンを使い化學的に分化の誘導が可能で、培養された一次神経のほとんどすべての重要な神経特性の発現が説明される。しかしながら、これらの細胞の化學的誘導は細胞分裂の終止も同時に説明する。

本実験において、NG108-15細胞は、ポリーリーシングでコートされた6穴プレート群で飼育培養された。それぞれの穴には40-50,000個の細胞群が2.5 mlの化學的に規定された培養液の中に入っている。3日に0.025%のトリフルオロ酢酸を含む50%エタノール中に入れた2.5 mlのOP-1をそれぞれの穴に加えた。0.1、1.0、4.0および10.0 ng/mlのOP-1濃度でテストが行われた。培養液は毎日OP-1の新しいアリコートに取り替えられた。4.0および10.0 ng/mlのOP-1濃度のものは4日後に、OP-1がNG108-15細胞群の分化を説明した。図5はそこで起こった形態形成変化を示す。OP-1は細胞群の漏氣および環状化ならびに神経突起の形

特表平6-506360 (21)

成(プロセス)を説明した。図5(純NC108-15細胞)と図5Bを比較すると、OP-1処理された細胞群の効果がわかる。このようにして、OP-1は細胞群が神経細胞形成へ分化してゆくのを説明することができる。いくつかの神経突起群はシナプス型の結合部へと接合してゆく。この効果は1-100ng/ml濃度のTGF-β1で培養された細胞群では見られなかった。

OP-1の神経誘導効果は、NC108-15細胞群に対する化学的分化用薬剤類との比較で示された。50,000個の細胞群が6穴プレート上で培養され、ブチレート、DMSO、フェルスコリンまたはOP-1で4日間処理された。細胞数のカウントによって、化学薬剤を含んだ培養液の中では、分化が細胞分裂の終止を行うことが示された。対照的に、OP-1で分化が誘導された細胞群は、H3チミジンの採取で確認されるとおり、分裂を続けた。このデータはOP-1が、分化の後培養中の細胞群の安定性を維持する能力のあることを示すものである。

さらに闇黙するもう一つの例として、本発明のモルフォゲン類の、皮膚細胞群の“再分化”を説明する能力についても評価が行われた。具体的には、OP-1のヒトEC細胞群(胎生癌細胞群、NTERA-ZCL-D1)に対する効果をここに開示した。外部からの刺激がない状態で、これらの細胞群は未分化の幹細胞群として維持され、無血清培養液(SMF)の中で成長が説明された。モルフォゲン処理がなされない場合、これらの細

胞群は勢いよく増殖し、固定液は無関係であった。モルフォゲン処理の効果は図6A-Dに示されている。図6Aおよび6Bは、SMF中における4日間の成長を示すもので、OP-1が存在した場合(25ng/ml、6A)またはモルフォゲンが存在しない場合(6B)である。図6Cおよび6Dは、5日間の成長を示すもので、10ng/mlのOP-1が存在した場合(6C)とモルフォゲンが存在しない場合(6D)である。図6Cおよび6Dは図6Aおよび6Bに対し、10倍および20倍の拡大率である。OP-1の存在下では、EC細胞は偏平細胞群に成長し、固定液依存性となるのがよくわかる。さらに、成長率は約10分の1に減少する。最後に、それらの細胞群の分化は説明された。

表現型の維持

本発明のモルフォゲン類はまた細胞の分化された表現型を維持するにも使われる。この形態形成能力は特に、静止または老衰細胞群の中で、表現型の継続的な発現を説明するのに有用である。

モルフォゲンの表現型維持能力は簡単に評価することができる。試験管の中で、標準培養条件下で多段階の過程を経過した後、多くの分化された細胞群が静止または老衰する。しかしもしも、これらの細胞群が本発明のモルフォゲンの1つと一緒に試験管の中で培養されると、その細胞群は多段階の過程で、彼らの表現型の発現を維持するように説明される。たとえば、培養された造骨細胞

群のアルカリ性ホスファターゼ(堿強酵素)の活動は、培養された骨肉腫細胞群や頭蓋冠細胞群と同じように、試験管の中では多段階の過程を経た後は大幅に減少する。しかしながら、もしそれらの細胞群がモルフォゲン(たとえばOP-1)の存在下で培養されると、アルカリ性ホスファターゼの活動性は長期間にわたって維持される。同じように、筋肉細胞群の表現型発現もまたこれらモルフォゲンの存在によって維持される。この実験は、異なるオリジンの細胞群に対する異なるモルフォゲン類の表現型維持能力を評価するために、その他のモルフォゲン類および異なる細胞群を用いて実施することができる。

表現型維持能力はまた生体でも、骨粗しょう症のためのラットモデル、すなわち1991年8月30日出願のUSSN752,857、審査中、に開示されているもので、ここにレフアレンスとして収録、を使用して評価することができる。そこで開示されているように、し。ロ。g。Evansラット群を、免清ホルモンの産生減少で骨粗しょう症の状態にするため、鼻孔挿出を行う。鼻孔挿出の8日後、ラット群に全身的に堿強酵素生理食塩水(PBS)またはOP-1(21μgまたは20μg)を22日間与える。しかし後ラット群を屠殺し、血清アルカリ性ホスファターゼのレベル、血清カルシウムレベル、血清骨カルシルシルバーレベルを、標準的な方法で測定する。OP-1を1または20μg与えたラット群では3倍高いレベルの骨カルシウムが認められた。アルカリ性

ホスファターゼレベルもまた増加しているのが認められた。けい骨骨幹における組織形態計量分析でOP-1は、エストロジエンレベルの低下による骨質量損を減らせることが判明した。

細胞にないする効果

本発明のモルフォゲン類が始原細胞群の増殖を刺激する能力もまた簡単に試験管内で評価することができる。有用な純粋細胞群としては、多分骨盤またはヘモ骨血液から標準的な方法で単離される多能性幹細胞群、(たとえば、Faradjiら、(1988) Vox Sano. 55(3):133-138またはBroxmeyer et al. (1989) PNAS 86(10):3828-3832参照)、ならびに血液から得られる純幹細胞群がある。あるいは、胎生細胞群(たとえば、培養された中胚葉細胞系統からの)も有用である。

始原細胞群を得るもう一つの方法ならびにモルフォゲン類の細胞増殖を刺激する能力を測定する方法は、始原細胞群を生体ソースから得まることである。たとえば、移入始原細胞群が流入できるような生体適合性のあるマトリックス材料を、生体中のあるサイトに始原細胞群の流入を許すぐらいために長時間移植する。たとえば、骨由来のグニアジン抽出のマトリックスを、たとえばSampath et al. ((1983) PNAS 80:6591-6595)、または米国特許No. 4,975,526に開示されている方法で作り、ラットの皮下部位に、基本的に

は Sampath の方法（同上）に従って移植する。3日後移植物を取り除くと、マトリックスと一緒にあった始原細胞群は処置され、培養される。

次に、どのようにして得た始原細胞群も、想定されるモルフォゲンとともに、当業界の普通の技術者にも公知の慣習的な細胞培養条件で、試験管培養をする。外部からの刺激がない状態では、その始原細胞群は増殖しないか、あるいはその培養液の中で最低限の増殖をする。しかしながら、もしもその細胞が OP-1 のようなモルフォゲンの存在下で培養されると、増殖するよう刺激される。細胞の成長は視覚的に確認するか、または公知の標準的な方法を用いて分光光度法で測定することができる。

始原細胞集団の増殖

始原細胞群は、生体内または生体外で、増殖するように刺激することができる。これらの細胞群は、個体内にモルフォゲンを含んだ医薬品处方を注射もしくは他の方法で与えることによって、生体内で刺激することができる。たとえば、個体の造血性の多能性幹細胞群は、個体の骨髄に適当な濃度のモルフォゲンを注射か何かを与えることによって、増殖するように刺激することができる。

増加させたい始原細胞個体群にモルフォゲンを、該図状態下で、細胞群の増殖を刺激するのに十分な濃度と時間接触させることによって、始原細胞群を生体外で刺激することができる。一般的には、約 10 分間から約 24

時間の期間で充分である。この後、刺激されたこれら細胞群を個体に、たとえば、適当な生体の遺伝子座に注入する。生体適合性のある適当な始原細胞群は、公知の方法もしくはここに述べた方法のいずれかで得ることができる。

損傷したまたは病気につかかった組織の再生

本発明のモルフォゲン類は、は乳動物の疾患もしくは損傷した組織の再生に用いることができる。再生しようとする組織は、好みしくは鑑定評価し、必要に応じて、過度の死滅性もしくは干渉しそうなはん癌組織を外科的、化学的、切除あるいはその他医学的に公知の方法で除去する。

しかし後、モルフォゲンを無菌で生体適合性のある組成物の一部として、直接組織遺伝子座に外科的移植法もしくは注射により与える。あるいは、モルフォゲン刺激を受けた始原細胞群を含む無菌の生体適合性のある組成物を組織の遺伝子座に与える。その遺伝子座に存在する組織は、病んでいたり損傷していても、始原細胞群の増殖および組織特異的分化をさせるための適当なマトリックスとなり得る。さらに、損傷したもしくは病んでいる組織の遺伝子座は、特に外科的手段でさらに傷められたものであっても、形態形成を許容する環境を与える。組織によっては、モルフォゲンを全身的に与えれば十分なこともある。

状態によっては、特に組織の損傷が広範な場合、その

組織が細胞の流入および増殖に十分なマトリックスを提供できないことがある。このような場合には、モルフォゲンもしくはモルフォゲン刺激をした始原細胞群を、下記のいずれかの方法で作られた生体適合性のある適当な固型マトリックスとともに、組織の遺伝子座に与える必要がある。このマトリックスは、組織特異性で生体内で生物分解性があり、かつ 70 - 850 μm、最も好みしくは 150 - 420 μm の範囲の大きさの粒子群で構成されているものが望ましい。

本発明のモルフォゲン類はまた、ケガのあとのはん癌組織の生成を防止もしくは実質的に生成させないようにするためにも使うことができる。もしモルフォゲンが新たに傷ついた組織の遺伝子座に与えられると、移入組織芽細胞の未分化の接着組織への集結を防止しながら、その遺伝子座に組織の形態形成を誘導することができる。このモルフォゲンは、ケガの後 5 時間以内に、無菌の医薬品としてその遺伝子座に注射によって与えることが望ましい。異なる組織に対するモルフォゲン類の再生能力を示す、いくつかの発明を限定しない事例をつぎに紹介する。本発明のプロテイン類は軟骨および軟骨内骨形成を誘導する能力があることを以前に示した（たとえば、米国特許 No. 5,011,691）。

一つの例として、部分的な肝切除後のかなり傷ついた肝臓組織のプロテイン誘導の形態形成が開示されている。この一般的なプロトコルの要點はその他の異なる組織群におけるモルフォゲン活性をテストするのにも使用でき

る。この一般的な方法には、組織の中の基本的に再生しない部分を切除すること、モルフォゲンを好みしくは溶解性の医薬品处方として、切除した組織の遺伝子座に与えること、キズをふさぎ、そのサイトを後日調べること、が含まれる。骨や肝臓のようなものは、胎児の段階以後は、キズついたあと再生する能力を潜在的に有している。

モルフォゲン、（たとえば、成熟形の精製組み換えヒト OP-1）を 0.1% のトリフルオロ酢酸（または同等の酸）を含む 50% エタノール（または同等の溶剤）に溶解させた（1 mg/ml）。OP-1 / 溶剤 - 酸の肝臓液 1 部を、滅菌した PBS（磷酸緩衝生理食塩水）に 0.2% のラット血清アルブミンを溶解させたもの 9 部で希釈して、注射可能な OP-1 液が作られた。

成長しつつあるラット群または成熟したラット群を、ケタミンを使って麻酔させた。2つの肝臓葉（右および左）を切除し（各葉の約 1/3）、それぞれの切断端に沿った複数のサイトに OP-1 を局所的に注射した。注入した OP-1 の量は、1.00 μg を 100 の PBS / RSA（磷酸緩衝生理食塩水 / ラット血清アルブミン）性肝臓液に入れたものであった。ラシーソナンブル類には OP-1 を入れない注射緩衝液を使用した。それぞれのグループには 5 匹ずつのラット群を使用した。傷をふさぎ、ラット群は通常の餌を食べられるように、また水道水を飲めるようにした。

12 日後、それらのラット群を屠殺し、肝臓の再生を目視観察した。図 7 の開放鏡写真は、肝臓再生に関する

OP-1の劇的な効果を示している。OP-1注入グループは完全な肝臓組織再生を示し、肝臓の中に切り傷跡はなんら残っていない（動物2）。対照的に、PBSだけを注射したコントロールグループではごく僅かな再生だけが認められた（動物1）。さらに、このグループのサンプルには切開した跡が残っていた。

もう一つ別の例として、本発明モルフォゲン類の象牙質形成を説明する能力も評価された。今日、歯科医療の分野においては歯髄組織のキズに対する予防せざる反応が治療上の根本的な問題である。

他の下等な非霊長類は乳動物類をベースとしたモデルよりも、謹がヒトの歯科生理学により近い指標になると思われることから、シノモルグス猿が靈長類のモデルとして選ばれた。

標準的な歯の外科的手順によって、サンプルの歯の歯のすぐ上のエナメル質および象牙質を（ドリリングによって）取り除き、歯髄の小さな面積（たとえば、2カ所）を外科的に露出させ、被冠側の髄組織を部分的に切断して、止血を誘導しながら、髄の処理、穴の仮封および充填を標準的な手順で行った。

使われた歯処理は：キャリヤマトリックスにOP-1を分散させたもの；キャリヤマトリックスだけで無処理のもの。1匹12本の歯（それぞれの処理に4本ずつ）を用意し、2匹の猿を使用。4週間後に、歯を抜き取り象牙質の生成状況を分析するために組織学的に処理、および/または象牙質の黒素質化を分析するためにすりつ

とした。図8はモルフォゲンの骨根取牙質修復の劇的な効果を示している。図8Aは対照処理（PBS）の顕微鏡写真で、修復はほとんど無いか全く見られなかった。図8Bはキャリヤだけの場合の顕微鏡写真で、最少の修復を示している。対照的に、モルフォゲン処理のもの（図8C）はかなりの修復を示した。図8の結果は、外科手術的に露出された健康な歯髄群に対し、確かにOP-1-CM（OP-1にキャリヤマトリックスを加えたもの）が修復的ないしは骨根取牙質ブリッジの形成を説明したこと示している。対照的に、キャリヤマトリックスだけで処理したもの、または処理しなかったものは、修復象牙質の形成はなかった。

もう一つの別として、中枢神経系（CNS）の修复に対するモルフォゲン説導の再生効果をラットの猫雀封モデルを使って評価することができる。要約すれば、このlong Evansラット群に麻酔をかけ、頭部手術の準備をする。頭蓋冠を標準的な外科手術手順で露出し、0.035Kのワイヤを使ってそれぞれの猫雀の中心に向かって穴を、ちょうど頭蓋冠を突き通すようにあける。モルフォゲン（OP-1、25μl）またはPBSのいずれかを含んだ25μlの溶液を、ハミルトンシリジングを使ってそれぞれの穴に入れる。溶液は表面から約3mmの深さまで、つまり下にある皮質、脛盤および海馬の中まで入れる。その後皮膚を縫合し、動物を回復させる。

手術の3日後、ラット群は断頭により屠殺し、それら

の脳をセクションに切り分けた。はん度組織形成の程度を定性的に測定するために、グリア原線維酸性プロテインに対する免疫蛍光着色法で評価した。グリア原線維酸性プロテインは神経膠はん度に関するマーカープロテインである。切り分けたセクション群について、OP-1の存在を確認するために抗-OP-1抗体でプローブ検査もした。モルフォゲンで処理した動物検体群の切片中のグリア原線維酸性プロテインのレベルが低いことは、モルフォゲンが神経膠はん度形成を抑制する能力を証明するものであり、それによって神経の再生を刺激することになる。

モルフォゲンの活性の調節

本発明のモルフォゲン類に対する抗体群は健康なヒトの血清で確認されている。さらに、モルフォゲン類（たとえば、OP-1）を含んだ移植用デバイス類が、抗-モルフォゲン抗体（たとえば、抗-OP-1抗体）の増加を説明するために、すでに免見されている。これらの抗体群は、生体内におけるモルフォゲン活動力に対する生体機制の一部分を構成するものと考えられる。抗体群の存在ならびにこれらのレベルの変動は簡単にモニターすることができ、それらは組織の均衡ならびに組織の生存度をモニターするための有用な方法を提供してくれることがある（たとえば、病理学的な状態の確認）。たとえば、腫瘍の放射免疫定量法あるいはELISA法で血清中の内因性抗-モルフォゲン抗体を検知し定量すること

ができる。抗-モルフォゲン抗体類を検知できる抗体群あるいはその他の拘束性プロテイン類は標準的な方法により得ることができる。

マトリックスの調整

本発明のモルフォゲン類は、生体適合性のある、好ましくは生体中で体内分解性のある適当に修飾されたマトリックス中に分散されて外科的に移植される。マトリックスは、中にモルフォゲンを分散させるためと始源細胞群の移入、分化および増殖をさせるための構造を与えるためである。マトリックスはまた、基本的に成長因子信号類を含まないので、分化する細胞群に組織特異性を方向付けるための信号類を与え、同時に形態形成を許容する環境を与えるものでなければならない。

これらの特性を備えたものでなければ、そのマトリックスは形態形成用組成物の部分としては適当なものではないことになる。骨成形用デバイス類（調整したマトリックス内にモルフォゲン類を分散したもの）に関する最近の研究において、ポリ酸およびまたはポリグリコール酸バイオポリマー類、セラミックス類（トリカルシウム-フォスファートの一つ）、またはヒドロキシアバタイトなどから作られたマトリックス類は、それ自体、ラット頭に新たな軟骨内骨成形を説明する適当な環境を与えることができないものであることが判明した。さらに、市場で入手できる高度に精製された再構成されたコラーゲン類または天然物から作られた種特異のコラーゲ

ン類（たとえば、ラットの尾の膜からの）で構成されたマトリックス類もまた骨原性プロテインとともに移植したとき骨形成を誘導することができなかった。これらのマトリックス類は明らかに、モルフォゲンに制御され分化する細胞細胞群の組織特異性の方向付けを助ける、待定の構造関連特性が欠如している。

調整されたマトリックスは、想定される手術で望まれるような形に作られたり、手術の最中に医師や技師によって必要な形に作ることができる。このようにこの材料は、組織を修復したり、新たにその成長を誘導するために、局所的、皮下、腹膜組織内、あるいは筋肉内の移植用に使用される。このマトリックスは生体内で生物分解性があるもの、つまり体に徐々に吸収されかつ新しい組織成長に、移植した形ないしはそれに近い形で、置きかえられるものが望ましい。

本発明に有用なマトリックス類の作り方および使用方法の詳細を次に説明する。

組織から作るマトリックス類

適切な生体適合性、生体内分解性のある無細胞性マトリックス類は天然の組織から作ることができる。組織の細胞性の非構造性成分を実質的に抽出するために、その組織を適当な処理液で処理する。この処理液は、その組織に固有している成長抑制成分も同時に抽出できるものでなければならない。こうしてできたらものは、多孔性、無細胞性の、非構造性成分が実質的に取り除かれた、マ

トリックス類である。

このマトリックスはさらに処理液で処理し、マトリックスの孔および表面の微細なくぼみの数を増やすような操作をすることができる。当業界の熟練技術者であれば、種々の組織の非構造性成分の抽出に最適の処理液を選択する方法を知っている。たとえば、肝臓や肺のような柔らかい組織であれば、薄く切り分け、組織の細胞性構造を壊し非構造性成分群を抽出するために、たとえば100%エタノールのような無選択性の溶剤にさらす。次に、この材料を乾燥し粉末に砕き、非付着性の多孔性粒子群を得る。コラーゲンが主成分であるような歯骨や象牙質のような構造性組織の場合には、基本的には Sampathらの方針（(1983) PNAS 80: 6591-6595）に準じて、脱脂し、脱水し、グアニジンで抽出をする。たとえば、粉末化され脱脂された象牙質は、5倍の4Mグアニジン塩酸、50mMトリニトロ塩酸を使用して、pH7.0、4°Cで16時間抽出する。次にこの懸濁液をろ過する。残った不溶分を回収し、マトリックスを作るために使用する。この材料はほとんどコラーゲン状のものである。これは形態形成能力に欠けるものである。このマトリックス粒子群をさらにコラーゲンの原継維修正薬剤で処理し、望ましくないと考えられる成分群をマトリックスから抽出すると同時にマトリックス材料の表面構造を変える。有用な処理液は酸類、有機溶剂類または加热した水溶性溶媒である。これらのマトリックス処理の詳細は、米国特許No. 4,975,526お

よりPCT広報US90/00912、1990年9月7日発行(WO90/10018)に開示されている。

現在最も好ましいとされている処理液は、マトリックスの粒子表面積および多孔度を増加させるための、水のような加热した水溶性の原継維修正溶媒である。現在最も好まれている水溶性溶媒はpH約4.5以下、たとえば、加热前のコラーゲンが“膨潤”するのを助けることができるようpH2-pH4の範囲、のものである。0.1%の酢酸、pH約3.5が現在最も好まれている。0.1Mの酢酸も使用可能である。

種々の量の脱脂、脱脂、グアニジン抽出された骨コラーゲンを、水ジャケット付きのガラスフラスコ中でコンスタントに搅はんしながら、水溶性溶媒（1gマトリックス/30ml水溶性溶媒）の中で、加热し、所定時間一定温度に保つ。処理時間としては1時間程度が好ましいが、0.5から2時間の間であればよい。使用する温度は37°Cから55°Cの範囲で一定に保つ。現在好まれている加热処理温度は約45°Cから60°Cの範囲内である。

この加热処理の後、そのマトリックスは漂過、洗浄、漂脂乾燥され、移植用に使われる。酸性の水溶性溶媒が使われたときは、そのマトリックスは洗浄、漂脂乾燥の前に中和される。現在好まれている中和用の緩衝液は、pH7.0の200 mM磷酸ナトリウム緩衝液である。マトリックスを中和するため、マトリックスは加热処理の後まず冷却され、酸性水溶性溶媒（たとえば、0.1%の

酢酸）が除去され、中和緩衝液に置き換えられ、約30分間そのマトリックスを振動する。そして中和緩衝液を除去し、マトリックスを洗浄し、漂脂乾燥する。

その他の有用な原継維修正処理としては、酸処理（たとえば、トリフルオロ酢酸および堿化水素）、ならびにジクロロメタン、アセトニトリル、イソプロパノール、クロロフォルムなどの溶剤ならびに特定の酸/溶剤の組み合わせによる溶剤処理がある。

原継維修正薬剤に接触させた後、処理されたそのマトリックスから残っている抽出成分群を除去するために、下記の手順に従って、洗浄する：

1. マトリックス調製品をTBS (Tris緩衝生理食塩水)中に懸垂し、4°Cで2時間漂はんする；またはpH7.0の6M尿素、50mMトリニトロ塩酸、500mM堿化ナトリウム溶媒(UTBS)または水の中で、30分間(pHを中和するに必要とされる充分な時間)室温(RT)で搅拌し、
2. 速心分離および、洗浄ステップをくりかえし、
3. 速心分離し、上澄み液を捨て、残留物を水洗し、漂脂乾燥する。

合成の組織特異性マトリックス類

上述の天然物からの組織特異性マトリックスに加えて、有用な組織特異性のマトリックスを合成によって、もし適正に合成されるならば、作ることもできる。これらの多孔性で生体適合性があり、生体中の体内分解性を抑え

特表平6-506360 (25)

た合成マトリックス類が、PCT広報US91/03503、発行1991年12月12日(WO91/18558)に開示されており、ここにレファレンスとして収録した。要約すれば、そのマトリックスは、生体適合性、体内分解性のあるコラーゲンならびに、組織特異性の細胞付着用因子群としての組織特異性のグリコサミノグリカン類の適当なものとの、多孔性架橋構造性ポリマーを含んだものである。不溶性コラーゲン、既に可溶のコラーゲン、中性または酸性水溶液に可溶のコラーゲン、市場で入手可能なコラーゲン類などを含めて、いろいろなソースからのコラーゲンがこれらの合成マトリックス類として使うに適当であろう。

グリコサミノグリカン類(GAGs)またはムコ多糖類は動物起源のヘキソースアミンを含んだ多糖類で、組織特異の分布を有しており、したがってモルファゲンに刺激された分化細胞群の組織特異性の決定を助けるために使うことができる。GAGsとの反応性はまたコラーゲンにもう一つ別の重要な特性、すなわち、動物宿主からの免疫反応(異物に対する反応)を誘発させない能力、を与えることになる。

化学的には、GAGsは、グリコシド結合し、幾つか規則的にヘキソウロン酸またはヘキソース部分のどちらかと入れ替わっているヘキソースアミン類から構成されている(例えば、*DodgsonらCarbohydrate Metabolism and its Disorders*(編集Dickensら) vol. 1、

Academic Press (1968) 参照)。有用なGAGsには、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘペリソサルフェート、コンドロイチン6-サルフェート、コンドロイチン4-サルフェート、デルマタンサルフェート、およびケラチンサルフェートがある。その他のGAGsもここに述べたマトリックスを作るのに適しており、当業界の熟練者はその他の適当なGAGsを知っているか、あるいは通常の実験操作を使うだけでそれらを確認することができる。ムコ多糖類のさらに詳細な記述は、*Aspinall, Polysaccharides, Pergamon Press, Oxford (1970)*を参照されたい。たとえば、米国特許出願No. 529,852に開示されているように、コンドロイチン6-サルフェートは軟骨内骨形成が要求されるところに使用できる。一方、ヘパリンサルフェートは肺組織の修復用のマトリックス類を作るのに使用できる。

コラーゲンは、水溶性の酸性糖被、好ましくは粘液された糖被の中で、GAGと反応させることができる。コラーゲンの水性分散液にGAGを滴下すると、GAGに被覆され、絡まったコラーゲン繊維の共沈物ができる。この絡まった纖維のかたまりをホモジナイズし、微細な纖維群の均一な分散液とし、ついで、ろ過および乾燥する。

コラーゲン-GAG組成物の不溶解性はこれらの材料を共有架橋結合させることによって望ましいレベルまで上げることができ、これはまたこれらの材料の再吸収に

対する抵抗性を上げることにも役立つ。一般的には、脱水サーマルプロセスによる架橋が好まれるが、コラーゲンの架橋に適する共有架橋方法であれば、いずれの方法もこれらの複合材料の架橋にも適する。

乾燥したとき、架橋された粒子は基本的に球状であり、直径約500μmである。走査電子顕微鏡によれば、表面の孔は約20μmで、内部の孔は約40μmである。内部は線維状およびシート様両方の構造物群からなっており、細胞付着用の裏面を提供している。空隙部は内部でつながっており、細胞群が粒子の内部のどこにでもアクセスできるようになっている。この材料の空隙容積はほぼ9.5%であり、ミクロキャリヤのグラム単位あたりの潜在的な細胞の質量、これは成長してゆくものであるが、という観点からは、極めて効率的な材料となっている。

ここに述べてきたモルファゲン類は、下記のいずれかの方法を使って、適切に修饰された組織特異のマトリックスと組み合わせ、そしてその中に分散させて使用することができる:

1. エタノールによる沈降

グアニジン-塩酸に溶解させたモルファゲン中にマトリックスを加える。サンプルははげしく攪拌はんし、低温でインキュベートする。サンプルはその後さらに透析はんされる。この混合物に冷凍エタノールを加え、攪拌はんし、インキュベートする。遠心分離(高速のミクロ遠心分離)の後、上澄み液を捨てる。マトリックスは冷凍

エタノールにより水の中で洗浄し、その後涙結乾燥する。

2. アセトニトリル3沸化酢酸による涙結乾燥

この手順において、アセトニトリル3沸化酢酸にモルファゲンを入れた溶液(ACN/TFA)をキャリヤ物質に加える。激しくサンプルを何度も攪拌はんし、その後涙結乾燥する。

3. 植物生理食塩水凍結乾燥

生理食塩水に入れたモルファゲン調製物もまたマトリックスとともににはげしく攪拌はんし、形態形成的に活性な物質を得るために涙結乾燥する。

生物学的評価

本発明のモルファゲン類および形態形成用組成物の、生体内における形態形成の有用性を評価するための種々の方法を次に示す。これらのプロテイン類および組成物類は、数多くの公知の方法のいずれかに従って、ほ乳動物に注射もしくは外科的に移植される。たとえば、外科的移植の生物学的評価は基本的にはSampathらの方法(1983)PNAS 80: 6591-6595に準拠して行う。

組織学的評価

生体内における形態形成の程度を調べるためにには、特に組織の移植の手順においては、組織学的な切り分け(セクショニング)および着色が好ましい。切りとられた

特表平6-506360 (26)

移植物は Bouin's 液中に固定され、バラフィンに埋め込まれ、6-8ミクのセクション毎に切り分けられる。トルイジンブルーまたはヘマトキシリン/エオシンによる着色によって新しい組織の最終的な発達が明確に示される。移植物が新しく誘導された組織を含んでいるかどうか確認するためには通常1-2日間の移植で十分である。

移植が成功する場合、誘導組織の発達ステージを通して、コントロールされた進度を示すため、起こっている組織特異的事象群を確認し追跡することができる。たとえば、軟骨内骨形成に含まれるステージは：(1) 1日目に白血球；(2) 2日目および3日目に間充細胞の移入および増殖；(3) 5日目および6日に軟骨細胞の出現；(4) 7日目に軟骨マトリックスの生成；(5) 8日目に軟骨の石灰化；(6) 9日目および10日に血管の侵入、造骨細胞群の出現、および新しい骨の生成；(7) 12日目から18日目にかけて造骨細胞および骨のリモデリングがあらわれ、移植したマトリックスが溶ける；(8) 21日目に小骨の中で造血性の骨髄分化、が含まれる。

生物学的標識群

組織学的評価に加えて、生物学的標識群も組織の形成過程のマーカーとして使うことができる。有用なマーカーとしては、組織特異の酵素群があり、移植物を均質化した後、それらの活動を評価分析（たとえば、分光光度法）によって）する。これらの評価分析は、移植物を動物から取り除いた後に、迅速に定量ならびに組織形成の推定をするのに有用である。たとえば、アルカリ性ホスファターゼの活動を骨形成におけるマーカーの一つとして利用することができる。

全身的に与えられたモルファゲン類はタグをつけた（たとえば、放射線でラベルをつけて）モルファゲン類を使って追跡し、新しい組織の中でのそれらの局在を確認したり、および/または種属系統からそれらが消失するのを、標準の原治追跡標識プロトコールを利用してモニターする。このモルファゲンはまた、組織特異の分子タグと一緒に与えることもでき、その取り込みをモニターしたり、与えられたモルファゲン濃度との相関性をみることができます。一つの例として、飼のラット群の筋膜除去は、結果として骨のアルカリ性ホスファターゼの低下を招き、それらのラット群を骨粗しょう症に向かわせた。もしこれらのラット群に今度はモルファゲン、たとえばOP-1を与えると、カルシウム(Ca2+)の全身的濃度の低下がみられ、これらは与えられたモルファゲンの存在と相関し、アルカリ性ホスファターゼ活性の増加との対応がみられる。

本発明の特徴または基本的な特性から逸脱せずに本発明を別の特定の形で実施することが可能である。本発明の実施例はしたがって、すべての点において説明のためのものであり、本発明を制限するものではない。発明の範囲は前述の説明にではなく、付帯の請求項に示されて

おり、したがって、あらゆる変更で請求項の意味および範囲に入るものはすべて、それらの請求項の範囲に入るものとみなす。

配 列 表

(1) 一般情報:

- (i) 特許出願人: コーヘン、チャールズ エム、クベラサンバス、サンガベルパン、ロイ エッチ、エル、オッバーマン、ハーマン リューガー、ディビッド シー。

(ii) 発明の名称: タンパク質によって誘導される

形態形成

- (iii) 配列の数: 23

(iv) 連絡先:

- (A) 所: テスク、ヘーウィン & チボルト
(B) 街: 53 ステート ストリート
(C) 市: ポストン
(D) 州: マサチューセッツ
(E) 国: アメリカ合衆国
(F) 郵便番号: 02109
(G) コンピュータで読み取り可能な形式:
(A) 録体: フロッピー ディスク
(B) コンピュータ: IBM PC 互換機
(C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
(D) ソフトウェア: Patentline
レリース No. 1,
バージョンNo. 1.25

(v) 先出願データ

- (A) 出願番号: US 667,274
(B) 出願日: 1991年3月11日

(vi) 先出願データ

- (A) 出願番号: US 752,754
(B) 出願日: 1991年8月30日

特表平6-506360 (27)

(2) SEQ ID No : 1 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 91アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

(A) 名称: 一般配列1

(D) その他の情報: 各Xaaは天然に存在する20のL-異性体α-アミノ酸のうちの1つまたはその1つの脱基体を示す。

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO:1

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1					5
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
10					15
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
20					25
Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
30					35
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
40					45
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
50					55
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
60					65
Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
70					75
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
80					85
Xaa	Cys	Xaa			
90					
					95

(2) SEQ ID No : 2 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 97アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

(A) 名称: 一般配列2

(D) その他の情報: 各Xaaは天然に存在する20のL-異性体α-アミノ酸のうちの1つまたはその1つの脱基体を示す。

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO:2

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1					5
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
10					15
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
20					25
Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
30					35
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
40					45
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
50					55
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
60					65
Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
70					75
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
80					85
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
90					

(2) SEQ ID No : 3 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 97アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

(A) 名称: 一般配列3

(D) その他の情報: 各Xaaは、この明細書中に示したような、1つまたは複数の指定されたアミノ酸のグループから、独立に選択される。

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO:3

Ieu	Tyr	Val	Xaa	Phe
1				5
Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Trp
10				
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
15				20
Xaa	Tyr	Cys	Xaa	Gly
25				30
Xaa	Pro	Ieu	Xaa	Xaa
35				
Xaa	Xaa	Xaa	Asn	Bla

(2) SEQ ID No : 4 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 102アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

(A) 名称: 一般配列4

(D) その他の情報: 各Xaaは、この明細書中に示したような、1つまたは複数の指定されたアミノ酸のグループから、独立に選択される。

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO:4

特表平6-506360 (28)

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Val Xaa Phe
 1 5 10
 Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
 15
 Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala
 20 25
 Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 30 35
 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 40
 Asn Xaa Xaa Ile His Ala Xaa Xaa
 45 50
 Xaa Xaa Leu Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
 55
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 60 65
 Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 70
 Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
 85
 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 90 95
 Xaa Cys Gly Cys Xaa
 100

(2) SEQ ID No: 5 に関する情報

- (i) 配列の特性
 - (A) 長さ: 139アミノ酸
 - (B) 類型: アミノ酸
 - (C) 形状: 直鎖
- (ii) 分子の種類: タンパク質
- (ix) 特性:
 - (A) 名称: hOP-1 (成熟形)
 - (xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 5

Ser Thr Gly Ser Lys Glu Arg Ser Glu
 1 5
 Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn Glu
 10 15
 Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala
 20 25
 Glu Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg Glu
 30 35
 Ala Cys Lys Glu Glu Leu Tyr Val
 40 45
 Ser Phe Arg Asp Leu Glu Trp Glu Asp
 50
 Trp Ile Ile Ala Pro Glu Glu Tyr Ala
 55 60
 Ala Tyr Tyr Cys Glu Glu Cys Ala
 65 70
 Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
 75 80
 Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu

85 90
 Val Ile Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val
 95
 Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu
 100 105
 Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 110 115
 Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys
 120 125
 Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala
 130 135
 Cys Gly Cys His

Glu Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg Glu
 30 35
 Ala Cys Lys Lys Glu Glu Leu Tyr Val
 40 45
 Ser Phe Arg Asp Leu Glu Trp Glu Asp
 50
 Trp Ile Ile Ala Pro Glu Glu Tyr Ala
 55 60
 Ala Tyr Tyr Cys Glu Glu Glu Cys Ala
 65 70
 Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
 75 80
 Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu
 85 90
 Val Ile Phe Ile Asn Pro Asp Thr Val
 95
 Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu
 100 105
 Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 110 115
 Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys
 120 125
 Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala
 130 135
 Cys Gly Cys His

(2) SEQ ID No: 5 に関する情報

- (i) 配列の特性
 - (A) 長さ: 139アミノ酸
 - (B) 類型: アミノ酸
 - (C) 形状: 直鎖
 - (ii) 分子の種類: タンパク質
 - (ix) 特性:
 - (A) 名称: mOP-1 (成熟形)
 - (xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 5
- Ser Thr Gly Gly Lys Glu Arg Ser Glu
 1 5
 Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn Glu
 10 15
 Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala
 20 25

特表平6-506360 (29)

(2) SEQ ID No: 7 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 139アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: ダンパク質

(ix) 特徴:

(A) 名称: hOP-2 (成熟形)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 7

Ala	Val	Arg	Pro	Leu	Arg	Arg	Arg	Glu
1								5
Pro	Lys	Lys	Ser	Asn	Glu	Leu	Pro	Gln
	10							15
Ala	Asn	Arg	Leu	Pro	Gly	Ile	Phe	Asp
	20							25
Asp	Val	His	Gly	Ser	His	Gly	Arg	Gln
	30							35
Val	Cys	Arg	Arg	Bis	Glu	Leu	Tyr	Val
	40							45
Ser	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Trp	Leu	Asp
	50							
Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Ile	Gly	Tyr	Ser
	55							60
Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Gly	Cys	Ser
	65							70
Phe	Pro	Leu	Asp	Ser	Cys	Met	Asn	Ala
	75							80
Tyr	Asn	Bis	Ala	Ile	Leu	Gln	Ser	Leu

85								90
Val	Ile	Leu	Met	Lys	Pro	Asn	Ala	Val
								95
Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Lys
	100							105
Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Leu	Tyr	Tyr
	110							115
Asp	Ser	Ser	Asn	Asn	Val	Ile	Leu	Arg
	120							125
Lys	Xia	Arg	Asn	Met	Val	Val	Lys	Ala
	130							135
Cys	Gly	Gly	Bis					

(2) SEQ ID No: 8 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 139アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: ダンパク質

(ix) 特徴:

(A) 名称: mOP-2 (成熟形)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 8

Ala	Ala	Arg	Pro	Leu	Lys	Arg	Asn	Gln
1								5
Pro	Lys	Lys	Thr	Asn	Gln	Leu	Pro	His
	10							15
Pro	Asn	Lys	Leu	Pro	Gly	Ile	Phe	Asp

20								25
Asp	Gly	Bis	Gly	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu
	30							35
Val	Cys	Arg	Arg	Bis	Glu	Leu	Tyr	Val
	40							45
Arg	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Leu	Asp
	50							
Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Gly	Gly	Tyr	Ser
	55							60
Ala	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala
	65							70
Phe	Pro	Leu	Asp	Ser	Cys	Met	Asn	Ala
	75							80
Thr	Asn	Xia	Ala	Ile	Leu	Gln	Ser	Leu
	85							90
Val	Asn	Leu	Met	Lys	Pro	Asp	Val	Val
	95							
Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Lys
	100							105
Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Leu	Tyr	Tyr
	110							115
Asp	Ser	Ser	Asn	Asn	Val	Ile	Leu	Arg
	120							125
Lys	Xia	Arg	Asn	Met	Val	Val	Lys	Ala
	130							135
Cys	Gly	Gly	Bis					

(2) SEQ ID No: 9 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 96アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(ii) 分子の種類: ダンパク質

(ix) 特徴:

(A) 名称: CBMP-2A (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 9

Cys	Lys	Arg	Bis	Pro	Leu	Tyr	Val	Asp	Phe	Ser
1								5	10	
Asp	Val	Gly	Ile	Asn	Asp	Trp	Ile	Val	Ala	Pro
	15							20		
Pro	Gly	Tyr	Bis	Ala	Phe	Tyr	Cys	His	Gly	Glu
	25							30		
Cys	Pro	Phe	Pro	Leu	Ala	Asp	Bis	Leu	Asn	Ser
	35							40		
Thr	Asn	Xia	Ala	Ile	Val	Gly	Thr	Leu	Val	Asn
	45							50		55
Ser	Val	Asn	Ser	Lys	Ile	Pro	Lys	Ala	Cys	Gly
	60							65		
Val	Pro	Thr	Gly	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser	Met	Leu
	70							75		
Tyr	Leu	Asp	Gly	Asn	Gly	Lys	Val	Val	Leu	Lys
	80							85		
Asn	Tyr	Gly	Asp	Met	Val	Val	Gly	Cys	Gly	
	90							95		
Cys	Arg									
100										

特表平6-506360 (30)

(2) SEQ ID NO: 10 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 101アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(II) 分子の種類: タンパク質

(Ix) 特徴:

(A) 名称: CBMP-2B (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 10

Cys	Arg	Arg	Gly	Ser						
1			5							
Leu	Tyr	Val	Asp	Phe	Ser					
10			Asp	Val	Asp					
Asp	Trp	Ile	Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gly	Ale
20			Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gly	Ale	
Phe	Tyr	Cys	His	Gly	Asp	Cys	Pro	Phe	Pro	Leu
30			35							
Ala	Asp	Gly	Leu	Asn	Ser	Thr	Asn	Gly	Ala	Ile
40				45						
Val	Gly	Thr	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Asn	Ser	Ser
50				55						60
Ile	Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Val	Pro	Thr	Gly	Leu
65						70				
Ser	Ala	Ile	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Asp	Gly	Tyr
75						80				85
Asp	Lys	Val	Val	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Gly	Asn
95						90				95
Val	Val	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Arg			
100										

(2) SEQ ID NO: 11 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 102アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(II) 分子の種類: タンパク質

(Ix) 特徴:

(A) 名称: DPP (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 11

Cys	Arg	Arg	Gly	Ser	Leu	Tyr	Val	Asp	Phe	Ser
1				5		10				
Asn	Val	Gly	Trp	Asp	Asn	Trp	Ile	Val	Ala	Pro
			15				20			
Leu	Gly	Tyr	Asp	Ala	Ile	Tyr	Ile	Cys	Gly	Lys
			25				30			
Cys	Pro	Phe	Pro	Leu	Ala	Asp	Bis	Phe	Asn	Ser
			35				40			
Thr	Asn	His	Ala	Val	Val	Gly	Thr	Leu	Val	Asn
			45				50			55
Asn	Asn	Asn	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Ala	Cys
			60				65			
Cys	Val	Pro	Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	Val	Ala	Asn
			70				75			
Leu	Tyr	Leu	Asn	Asp	Gly	Ser	Thr	Val	Leu	
			80				85			
Lys	Asn	Tyr	Gly	Gly	Asn	Asp	Thr	Val	Val	Gly
			90				95			
Gly	Cys	Arg								
100										

(2) SEQ ID NO: 12 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 102アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(II) 分子の種類: タンパク質

(Ix) 特徴:

(A) 名称: Vg I (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 12

Cys	Lys	Lys	Arg	Gly	Ser	Leu	Tyr	Val	Gly	Phe	Lys
1				5		10					
Asp	Val	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Trp	Val	Ile	Ala	Pro
			15				20				
Gly	Gly	Tyr	Asn	Ala	Asn	Tyr	Cys	Tyr	Gly	Gly	
			25				30				
Cys	Pro	Tyr	Pro	Leu	Thr	Gly	Ile	Leu	Asn	Gly	
			35				40				
Ser	Asn	His	Ala	Ile	Leu	Gly	Thr	Leu	Val	Gly	
			45				50			55	
Ser	Ile	Gly	Pro	Gly	Asp	Ile	Pro	Leu	Pro	Cys	
			60				65				
Cys	Val	Pro	Thr	Lys	Asn	Ser	Pro	Ile	Ser	Asn	
			70				75				
Leu	Phe	Tyr	Asp	Asn	Asn	Asp	Val	Val	Leu		
			80				85				
Arg	Ile	Tyr	Gly	Asn	Asn	Asp	Val	Asp	Gly	Cys	
			90				95				
Gly	Cys	Arg									
100											

(2) SEQ ID NO: 13 に関する情報

(1) 配列の特性

(A) 長さ: 102アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 形状: 直鎖

(II) 分子の種類: タンパク質

(Ix) 特徴:

(A) 名称: Vg r-1 (fx)

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 13

Cys	Lys	Lys	Asn	Gly	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Gly	
1				5		10					
Asp	Val	Gly	Trp	Gly	Asn	Asn	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro
			15				20				
Xaa	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asn	Asn	Tyr	Cys	Asp	Gly	Gly
			25				30				
Cys	Ser	Phe	Pro	Leu	Asn	Ala	Ala	Asn	Asn	Ala	
			35				40				
Thr	Asn	Asn	Ala	Ile	Val	Gly	Thr	Leu	Val	Ile	
			45				50			55	
Val	Asn	Asn	Pro	Gly	Tyr	Val	Pro	Lys	Pro	Cys	
			60				65				
Cys	Ala	Pro	Thr	Lys	Val	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	
			70				75				
Leu	Tyr	Pho	Asp	Asp	Asn	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	
			80				85				
Lys	Lys	Tyr	Arg	Ile	Asn	Asp	Val	Val	Arg	Ala	Cys
			90				95				
Gly	Cys	Ile									
100											

特表平6-506360 (31)

(2) SEQ ID No: 14 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 106 アミノ酸

(B) 種類: ダンパク質

(C) 量数: 単純

(D) 形状: 直線

(ii) 分子の種類: ダンパク質

(vi) 起源

(A) 生物: ヒト

(F) 地域: 日本

(ix) 特徴:

(D) その他の情報:

/product = "GDF-1 (f x)"

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 14

Cys	Arg	Glu	Ala	Arg	Arg	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Arg	Glu	Val	Gly		
1	5					10										
Trp	His	Ile	Arg	Ile	Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Arg	Gly	Phe	Leu	Ala	Asn	Tyr
15					20							25				
Cys	Gln	Gly	Gln	Cys	Ala	Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Ser	Gly				
30				35				40								
Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Asn	His	Ala	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Met	Ser		
45			50				55									
Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Ala	Ala	Asp	Leu	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Ala		
60			65				70									
Arg	Leu	Ser	Pro	Ile	Ser	Val	Leu	Phe	Phe	Asp	Asn	Ser	Asp	Asn		
75			80				85									
Val	Val	Leu	Arg	Gly	Ile	Tyr	Gly	Asp	Met	Val	Val	Asp	Gly	Cys	Gly	
90			95				100									
Cys	Arg															
105																

GGTCCCCCCC CGGGAGCCCC AGCCCCCGCTA CGGGGTAGAG CGGGCCCG ATG CAC GTC	57
Met His Val	
1	

CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CGG CAC AGC AGG TTC CTG GCG CTC TCG GCA	105	
Arg Ser Leu Arg Ala Ile Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala		
5	10	15

CCC CTG TTC CTG CTG CGG CGG CGC GAC TAC AGC CTG GAC AAC	153		
Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Ile			
20	25	30	35

GAG GTG CAC TCG ACC TTC ATC GAC CGG CGG CTC CGC AGC CAG GAG CGG	201	
Gly Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Glu Glu Arg		
40	45	50

CGG GAG ATG CAG CGG GAG ATC CTC TCC ATT TTG GGC TTG CGG CAG CGG	249	
Arg Glu Met Glu Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg		
55	60	65

CGG CGG CGG CTC CAG CGC AAG CAC AAC TCG GCA CCC ATG TTC ATG	287	
Pro Arg Pro His Leu Glu Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met		
70	75	80

CTG GAC CTG TAC AAC CGC ATG GCG GTG GAG GAG CGG CGG CGC GGC	345	
Leu Asn Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Glu Pro Gly		
85	90	95

GGC GAG GGC TTC TCC TAC CGG TAC CGC AAG CGC GTC TTC ACT ACC GAG	393
---	-----

(2) SEQ ID No: 15 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 5 アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) 量数: 単純

(D) 形状: 直線

(ii) 分子の種類: ペプチド

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 15

Cys Ile Asn Xaa Xaa Xaa

1 5

(2) SEQ ID No: 16 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 1822 塩基対

(B) 種類: 核酸

(C) 量数: 単純

(D) 形状: 直線

(ii) 分子の種類: cDNA

(vi) 起源

(A) 生物: ヒト

(B) 地域: 海馬

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: CDS

(B) 場所: 49.. 1341

(D) その他の情報: /standard-name = "hOP1"

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 16

Gly	Gln	Gly	Phe	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Gln	Gly	
100	105									110				115		
1																

CCC CCT CTG GCC ACC CGT CAA GAT AGC CAT TTC CTC ACC GAC CGG GAC	441															
Pro Pro Leu Ala Ser Leu Glu Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp																
120	125	130														

AIG GTC ATG ACC TTC GTC AAC CTC GIC GIC GAA CAT GAC AAG GAA TTC TGC	489															
Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe																
135	140	145														

CAC CCA CGC TAC CAC CAT CGA GAG TTC CGG TTT GAT CTC TCC AAC ATC	537															
Bis Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile																
150	155	160														

CGA GAA GGG GAA GCT GTC ACC GCA GGC GAA TTC CGG ATC TAC AAC GAC	585															
Pro Glu Glu Glu Ala Val Thr Asn Asn Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp																
165	170	175														

TAC ATC CGG GAA GGC TTC GAC AAT GAG ACC TTC CGG ATC ACC GTT TAT	633															
Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile Ser Val Tyr																
180	185	190	195													

CAG GTG CTC CAG GAG CAC TTY GGC AGC GAA TCC GAT CTC TTC CTG CIC	681															
Glu Val Leu Glu Glu Glu Leu Glu Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu																
200	205	210														

GAC AGC CGT ACC CTC TGG GCC TCG GAG GAG CGC TGG CTC GTG TTT GAC	729
Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ile Ser Glu Glu Glu Cys Trp Leu Val Phe Asp	

特表平6-506360 (32)

215	220	225		CGA GAC CTG CGC TGG CAG GAC TGG ATC ATC CGG CCT GAA GGC TAC CGC 1113
				Arg Asp Leu Gly Trp Gin Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala
				340 345 350 355
ATC ACA GCC ACC AGC AAC CAC CAC TGG GTG GTC AAT CGG CGG CAC AAC CTG Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg Ile Asn Leu				GCC TAC TAC TGT GAG CGG GAG TCT GCC TIC CGT CGC AAC TCC TAC ATC 1161
230 235 240				Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met
				360 365 370
GGC CTG CAG CTC TCG CTC GAG ACC CTG GAT CGG CAG ACC ATC AAC CGC 825				AAC CGC ACC AAC CAC CCC ATC CTG CAG ACC CTG CAC TTC ATC AAC 1209
Gly Leu Cln Leu Ser Val Gin Thr Leu Asp Glu Gin Ser Ile Asn Pro				Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gin Thr Leu Val His Phe Ile Asn
245 250 255				375 380 385
AAC TTC GCG CGC CTC ATT CGG CGG CAC CGG CCC CAG AAC ATG CGG CCC 973				CGG GAG ACC GTG CGC AAG CGC TCC TGT CGG CGC ACC CGC TCT AAC 1257
Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gin Asn Lys Glu Pro				Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Gys Gys Ala Pro Thr Glu Leu Ile Ala
260 265 270 275				390 395 400
TTC ATG GTG GCT TTC TTC AAC GGC ACC GAG CTC CAG TCC CGC ACC ATC 921				ATC TCC GTC CTC TAC TTC CAT GAC ACC TCC AAC GTC ATC CTG AAC AAA 1305
Phe Met Val Ala Phe Phe Asn Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile				Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys
280 285 290				405 410 415
GGG TCC ACC GGG AGC AAA GAG CGG AGC CGG AAC CGC TCC AAC AGG CGC 969				TAC AGA AAC ATG CTG CTG CGG CGG TGT CGC TCC CAC TAGCTCCCTCC 1351
Arg Ser Thr Glu Ser Lys Glu Arg Ser Glu Asn Arg Ser Lys Thr Pro				Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Glu Cys His
295 300 305				420 425 430
AAG AAC CAG GAA GCC CTG CGG ATG CGC AAC GTG CCA GAG AAC ATC ACC 1017				GAGAATTCAAG ACCCTTTCGG GCGAAGTTTC TCTGGATGCTT CCATTCCTCG CCCTGGCCAG 1411
Lys Asn Glu Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser				GAACCCAGAG ACCAACCTGCC TTTTGAGAGA CCTTCCCCCTC CCTATCCCCA ACTTTTAAAGG 1471
310 315 320				
AGC GAC CAG AGG CAG GCC TGT AAG AAC CAC GAG CTG TAT GTC ACC TTC 1065				
Ser Asp Glu Arg Glu Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe				
325 330 335				

TGTGAGAGTA TTAGGAAACA TGAGGAGCAT ATGGCTTTG ATCAGTTTTG CAGTGGCAGC 1531
ATCCANTCAA CAAGATCCCTA CAACGCTCTCC AGGCCAAAGCC TAGCAGGAA AAAGAACAGC 1591
GGATTAAGAA AAATGGCCCGG GCCAGGTCAT TGGCTTGAAA CTCTCTAGCCA TGGACCGGACT 1651
GGTTTCCAGA GGTAATTTACG AGCCGCTACC AGCCGAGGCCA CCCAGGGCTG CGAGGAAGG 1711
GGCGTGGCAA GGGGTGGGCA CATGGGTCGTC TGGCGGAAG GAAATATGAC CGCGAAGTTC 1771
CTGTAATAAA TGTCAACAATA AAACGGAAATCA ATGAAAGAAA AAAAAAAA A 1822

(2) SEQ ID No: 17 に該する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 431アミノ酸

(B) 産地: アミノ酸

(C) 形状: 連鎖

(ii) 分子の種類: プロテイン

(iii) 特徴:

(D) その他の情報: /Product-/OP1-PP"

(iv) 配列の識別名: SEQ ID NO: 17

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
1 5 10 15
Leu Ile Asp Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Ile Phe Ser
20 25 30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
35 40 45

Gln Glu Arg Arg Glu Met Glu Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
50 55 60

Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Glu Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
65 70 75 80

His Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
85 90 95

Gly Pro Gly Gly Ser Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
100 105 110

Thr Glu Glu Pro Pro Leu Ala Ser Leu Glu Asp Ser His Phe Leu Thr
115 120 125

Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
130 135 140

Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
145 150 155 160

Ser Lys Ile Pro Glu Glu Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
165 170 175

Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
180 185 190

特表平6-506360 (33)

Ser Val Tyr Glu Val Leu Glu Glu His Leu Gly Arg Cys Ser Asp Leu 195 200 205	340	345	350
Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Tyr Leu 210 215 220	Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp 355 360 365		
Ile Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asp Glu Trp Val Val Asn Pro Arg 225 230 235 240	Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu Val His 370 375 380		
His Asn Leu Glu Leu Glu Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Glu Glu Ser 245 250 255	Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Glu 385 390 395 400		
Ile Asn Pro Lys Leu Ala Glu Leu Ile Cys Arg Glu Glu Pro Glu Asn 250 255 270	Leu Asn Ile Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile 405 410 415		
Lys Glu Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe 275 280 285	Leu Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Val Arg Ala Cys Glu Cys His 420 425 430		
Arg Ser Ile Arg Ser Thr Glu Ser Lys Glu Arg Ser Glu Asn Arg Ser 290 295 300	(2) SEQ ID No : 18 に関する情報		
Lys Thr Pro Lys Asn Glu Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu 305 310 315 320	(i) 配列の特性		
Asn Ser Ser Ser Asp Glu Arg Glu Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr 325 330 335	(A) 長さ： 1873 基塩対		
Val Ser Phe Arg Asp Leu Glu Trp His Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu	(B) 種類： 植物		

(ii) 長さ： 単純

(C) 量数： 単純

(D) 形状： 直線

(E) 分子の種類： cDNA

(F) 起源

(G) 生物： 木ズキ科の動物

(H) 補助： 幼児

(I) 特性：

(A) 名称/キー： CDS	
(B) 場所： 104..1393	
(C) その他の情報： /note="MOP1 (cDNA)"	
(D) 配列の識別名： SEQ ID NC:18	
CTGCAGCGAG TGAACCTCGGG TGTGTGACAG CTGGCCCTGCC CGCTCTGGCGTG CGACCTGGGG 60	GAC CTG TAC AAC GCC ATG SGG GTG GAG GAG AGC GGG CGG GAC GGA CAG 403
CGGCCCGGGCG CGGGTGGCCC CGATCGCGCG TAGAGCCGGC CGC ATG CAC GTG CGC 115	Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Ser Cys Pro Asp Glu Gin 85 90 95 100
Met His Val Arg 1	GGC TTC TCC TAC CGC TAC AAG GGC GTC TTC AGT ACC CAG GGC CCC CCT 451
TCC CTC CGC CCT CGG CGC CCA CAC AGC TTC GTG CGG CTC TCG SGG CCT 163	Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Glu Gly Pro Pro 105 110 115
Ser Leu Arg Ala Ala Asn Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala Pro 5 10 15 20	TTA GCC AGC CTC CAG GAC AGC CAT TTC CTC ACT GAC GCC GAC ATG GTC 499
Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn Glu 25 30 35	Leu Ala Ser Leu Glu Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp Met Val 120 125 130
CTG TCC TCG CGC TCC CGC CTC CGG CAT TTC AGC CTC CAG AAC GAG 211	ATG AGC TTC GTC AAC CTA GTG GAA CAT GAC AAA GAA TTC TTC GAC CCT 547
Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn Glu 25 30 35	Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe His Pro 135 140 145
GTC CAC TCC AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGG AGC CAG SAG CGG CGG 259	CGA TAC CAC CAT CGG GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC CGG GAG 595
Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Glu Glu Arg Arg 40 45 50	Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile Pro Glu 150 155 160
GAG ATG CAG CGG GAG ATC CTG TCC ATC TTA GGG TTG CGG CAT CGG CGG 307	GGC GAA CGG CGT ACC GCA CGG GAA TTC AGG ATC TAT AAG GAC TAC ATC 643
Glu Met Glu Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Glu Leu Pro His Arg Pro 55 60 65	Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp Tyr Ile 165 170 175 180
Arg Pro His Leu Glu Glu Ile His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met Leu 70 75 80	CGG GAG CGA TTT GAC AAC GAG ACC TTC CAG ATC AGA GTC TAT CAG TGG 691
Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Ile Phe Glu Ile Thr Val Tyr Glu Ile	Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Ile Phe Glu Ile Thr Val Tyr Glu Ile 185 190 195

特表平6-506360 (34)

CTG CAG GAG CAC TCA GGC AGG TAG TCG GAC CTC TTC TTS CTG GAC AGC Leu Glu Glu Ala Ser Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Ile Ser	739	Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ile Glu Asn Ser Ser Ser Asp 310 315 320
200 205 210		
CGC ACC ATC TGG GGT TCT TAT GAG GAG GGC TGG TTT GTC AGT ATC ACA Arg Thr Ile Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Ile Val Phe Asp Ile Thr	787	CAG AGG CAG CCC TCC AAC AAA CAT TAC CTC TAC GTC AGC TTC CGA GAC Gln Arg Glu Ala Cys Lys Lys Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp 325 330 335 340
215 220 225		
GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAC CCT CCC GAC AAC CTC GGC TTG Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu Glu Leu	835	CYT GCC TGG CAG CAC TGG ATC ATT CCA CCT GAA GGC TAT GCT GCC TAC Leu Glu Trp Glu Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Glu Tyr Ala Ala Tyr 345 350 355
230 235 240		
CAG CTC TCT GTG CAG ACC CTG GAT GGC CAG AGC TCC AAC CCC AAC TTC Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Glu Ser Ile Asn Pro Lys Leu	883	TAC TCT CAG GCA GAG TCC CCC TYC CCT CTC AAC TCC TAC ATG AAC CCC Tyr Cys Glu Glu Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asp Ala 350 355 370
245 250 255 260		
GCA GGC CTG ATT GGA CGG CAT GGA CCC CAG AAC AAG CAA CCC TTC ATG Ala Glu Leu Ile Glu Arg His Glu Pro Glu Asn Lys Glu Pro Phe Met	931	ACA AAC CAC GCC ATC GTC CAG ACA CTC GTC CCT TCC ATC AAC CCA GAC Thr Asn His Ile Ile Val Glu Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro Asp 375 380 385
265 270 275		
GTG GGC TYC TAC AAC GGC ACC GAA GTC CAT CTC CCT AGT ATC CGG TCC Val Asn Phe Lys Ile Thr Glu Val His Leu Arg Ser Ile Asp Ser	979	CTC CTC TAC TGC GAC GAC AGC TCT ATT GTC ATC CTC AAC AGC AAC TCA Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Tyr Arg 405 410 415 420
280 285 290		
AGG GGG GGC AAC CAG CCC ACC AGC CAG AAT CCC TCC AAC AGC CCA AAC AAC Thr Glu Glu Asn Arg Ser Glu Asn Arg Ser Lys Ile Pro Lys Asn	1027	SAC ATG GTG GTC CGG CCC TGT GGC TCC CAC TAGCTCTTCC TGAGACCCGT Asn Met Val Val Arg Ala Cys Glu Cys Xis 425 430
295 300 305		
CAA GAG GGC CTG AGC ATG GGC AGT GTG GCA GAA AAC AGC AGC AGT GAC 1075		

ACCTTTCGGG GGCACACCTT TTCCAAATCTY TCGATGTCCTC ACCATCTAAC TCTCTCACCT 1473	Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala 1 5 10 15
CCGCACCTTGG CGAGGAGAAC AGACCAACCTT CTCCCTGACCC TCCCCCTAACCC TCCCCAACCGG 1533	Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ile Asp Phe Ser 20 25 30
AAAGCATGTAAG CGGTTCAGAGA AACCTGAGGG TGCAAGGAGCT GATGAGGGCC CTTTCCTCT 1593	Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser 35 40 45
GGCACGTCAC GGAGCAGAGCT CTACAGGCTA CGACAGGAAA CGCCCTAGAG CAGGGAAAT 1653	Gln Glu Arg Arg Glu Met Glu Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Glu Lys 50 55 60
GTCTGCCAGG AAAGTGTCCTA GTCTTCACAT GGGCCCTGGC CCTCTGAGTC TTTCAGGACT 1713	Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Glu Glu Lys His Asn Ser Ala Pro 65 70 75 80
AAATGCCAAGC CTCGGTACGG TOCACCAAGC GGAAGGGCTT AGCCAGGGTG GGGGCTGGGG 1773	Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met His Val Glu Glu Ser Glu 85 90 95
TCTGTGTTGA AGGGAAACCA ACCAGAAGCC ACTGTAATGA TATGTCACAA TAAAGACCCAT 1833	Pro Asp Glu Glu Glu Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr 100 105 110
GAATGAAAAA AAAAAAAAGA AAAAAAAAGA AAAAAAGATTG 1873	Gln Glu Pro Pro Leu Ala Ser Leu Glu Asp Ser His Phe Leu Thr Asp 115 120 125

(2) SEQ ID No: 19 に関する情報

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 430 アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(D) 形状: 量質

(II) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

(D) その他の情報: /product= "mOP1-PP"

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 19

特表平6-506360 (35)

Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser				Thr Pro Lys Ile Gin Gin Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala Glu Asn			
145	150	155	160	305	310	315	320
Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr				Ser Ser Ser Asp Gin Arg Gin Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val			
165	170	175		325	330	335	
Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Glu Ile Thr				Ser Phe Arg Asp Leu Gly Ile Trp Gin Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly			
180	185	190		340	345	350	
Val Tyr Gin Trp Leu Gin Glu His Ser Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe				Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser			
195	200	205		355	360	365	
Leu Leu Asp Ser Arg Thr Ile Trp Ala Ser Glu Glu Gly Ile Trp Leu Val				Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Glu Thr Leu Val His Phe			
210	215	220		370	375	380	
Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His				Ile Asn Pro Asp Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gin Leu			
225	230	235	240	385	390	395	400
Asn Leu Gly Leu Glu Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Glu Ser Ile				Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu			
245	250	255		405	410	415	
Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Glu Asn Lys				Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Gly Glu Cys His			
260	265	270		420	425	430	
Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Leu Arg							
275	280	285					
Ser Ile Arg Ser Thr Gly Gly Lys Glu Asn Ser Gin Asn Arg Ser Lys							
290	295	300					

(2) SEQ ID No: 20 に関する情報

(1) 配列の特性

- (A) 長さ: 1723 基塩対
- (B) 構成: 核酸

- (C) 種類: 単鎖
- (D) 形状: 直線

(11) 分子の種類: cDNA

(vi) 組成

(A) 生物: ヒト

(B) 級属: 人

(ix) 特徴:

(A) 名称/キー: CDS

(B) 場所: 490..1596

(C) その他の情報: /note= "hOP2 (cDNA)"

(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 20

GGCCCCGGCA GAGCAGGAGCT GGCCTGGAGGA CCTCTGGTTG GACCAAGGAGG TGGCACCGCA	60
GGCTCTGGAGG GTCCTCCATCT AGCTGCGGAGG AGCCCCCCCAGG AGGGCGCTGGA GCAACAGCTC	120
CCACACCGCA CCAAGCGGTG GCTCCAGGAG CTGGCGGCTAC GGGCTCTGGC TGGCTGGAGC	180
GGGGCCACAG CGGGGACTGCCG GGGTACGGGA CGGACAGAGG CATTGGCCGA GAGTCCCACT	240
CGGGCACTTA GCCCCGGGCT GTAGGGGGTG GGGCTCCCTGT CGTCGCGCTTC CAGGGACCGAG	300
GACAGGTGTC CGGGGGGGGG GCTCCAGGGA CGGGGGCTCA GGGGGGGCTGC GGGGGGGCTGC	360
GGCCCCGGGGCG CGGGGGGGGG GGGGGGGGGCTC CTGGGGGGTG GGGGGGGGGCTGC	420
AGGGGGCTGG TGAGGGGGGGGG AGGGGGGGGG GGGGGGGGGTG GGGGGGGGGTG GGGGGGGGGCTGC	480
CGGGGGGGCTGC ATG ACC GGG CTC CCC GGG CCG CTC TGG CTC CTC GGG CTC	523

Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu			
1	5	10	
GGG CTA TCC GCG CTC GCG GGG GGC GGC CCC CCC CTG CGA CCC CCC CGG CCC	576		
Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Pro			
15	20	25	
GGC TGT CCC CAG CGA CGT CTG CGC GCG CGG GAG CGG CGG GAC CTG CAG	584		
Gly Cys Pro Glu Arg Asn Leu Gly Ala Arg Glu Asn Asp Val Glu			
30	35	40	45
GGC GAG ATC CTG CGG GTG CTC CGG CTG CCT GGG CGG CCC CGG CCC CGG	672		
Arg Glu Ile Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg			
50	55	60	
GGG CGA CGG CGC CGC TCC CGG CGC CCC CGG TCC CGG CGG CGC CTC TTC ATG	720		
Ala Pro Pro Ile Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met			
65	70	75	
CTG GAC CTG TAC CGC ATG CGC CGC CGC GAC GAC GAC GAC GAC CGG	768		
Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Ala Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala			
80	85	90	
CCC CGG GAG CGG CGC CTG CGG CGC CGC GAC CTG CGC ATG ACG TTC STT	816		
Pro Ala Glu Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val			
95	100	105	
ATC ATG GTG GAG CGA CGT CGC CTG CGC CGC CAG GAG CGG CAT TCG	864		
Asn Met Val Glu Arg Arg Ala Leu Gly His Glu Pro His Trp			
110	115	120	125

特表平6-506360 (36)

AAC GAG TTC CCC TTT GAC CTG ACC CAG ATC CGG CCT GGG GAG CGG GTC Lys Glu Phe Arg Phe Asp Leu Thr Glu Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val 130 135 140	912	CAA CGG CCC CCA CGC TCC CAA CAG CCT TTC CTG CTC ACT TTC TTC CGG Gln Arg Ala Pro Ile Ser Glu Glu Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg 240 245 250	1248		
ACG CCT GCG GAG TTC CGG ATT TAC AAC GAG GTC CCC AGC ATC CGC CTG CTC Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu 145 150 155	960	GCC AGT CGG AGT CCC ATC CGG ACC CCT CGG GCA GTC AGG CCA CTG AGG Ala Ser Pro Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg 255 260 265	1256		
AAC AGG ACC CTC CAC GTC AGC ATG TTC CTC CAG CTG GTC CAG GAG CAG TCC Asn Arg Thr Leu His Val Ser Met Phe Glu Val Val Glu Glu Glu Ser 160 165 170	1008	AGC AGG CAG CGG AAC AAA AAC GAG CTG CGG CAG CCC AAC CGA CTC Arg Arg Glu Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Glu Ala Asn Arg Leu 270 275 280 285	1344		
AAC AGG GAG TCT GAC TTC TGC TTT TGC GAT CTT CAG AGC CTC CGA GCT Asn Arg Glu Ser Asn Leu Phe Phe Leu Asp Leu Glu Thr Leu Arg Ala 175 180 185	1056	CCA CGG ATC TTT GAT GAC GTC CAC CGG TCC CAC CGG CGG CAG GTC TGC Pro Glu Ile Phe Asp Asp Val Val His Glu Ser His Glu Val Cys 290 295 300	1392		
GGA GAC GAG GGC TGG CTG CTG CTG GAT GTC GIC ACA GCA GGC AGT GAC TGC Gly Asp Glu Glu Glu Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys 190 195 200 205	1104	CGT CGG CAG GAG CTC TAC GTC AGC TTC CAG GAC CTC CGC TGG CTC GAC Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Glu Asp Leu Glu Trp Leu Asp 305 310 315	1440		
TGG TTG CTG AAC CGT CAC AAC GAC CTG CGA CTC CGG CTC TAT GTG GAG Trp Leu Leu Lys Arg His Lys Asp Leu Glu Leu Arg Leu Tyr Val Glu 210 215 220	1152	TGG GTC ATC GCT CCC CAA EGC TAC TCG GCC TAT TAC TGT GAD CGG GAG Trp Val Ile Ala Pro Glu Glu Tyr Ser Ala Tyr Tyr Tyr Cys Glu Glu Glu 320 325 330	1488		
ACT GAG GAC GGG CAC AGC GTG GAT CCT CGC CTG CGG CGC CTG CTG GGT Thr Glu Asp Glu His Ser Val Asp Pro Glu Leu Ala Glu Leu Leu Glu 225 230 235	1209	TGG TCC TTC CCA CGG CAC TCC TGG ATG AAT GCC ACC AAC CAG CGG ATC Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Ile His Ala Ile 335 340 345	1536		
				CTG CAG TCC CTG GTC CAC CTC ATG AAC CCA AAC CCA GTC CGG CCC AAC CGG	1584

Leu Glu Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val Pro Lys Ala 350 355 360 365	365	Gln Arg Arg Leu Glu Ala Arg Glu Arg Arg Asp Val Glu Arg Glu Ile 370 375 380	35 40 45
TGG TGT GCA CCC ACC AAC GAG CTG ACC CGC ACC TCT CTG CTC TAC TAT GAC Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp 385 390 395	1632	Leu Ala Val Leu Glu Leu Pro Glu Arg Pro Arg Ala Pro Pro 65 70 75 80	
AGC AGC AAC AAC GTC ATC CTG CGC AAA AAC CAC CGC AAC ATG GTG GTC AAC Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His Arg Asn Met Val Val Lys 400	1680	Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu 85 90 95	
GGC TCC CGC TCC CAC T GAGTCAGCCC SCGCCAGCCCT ATCTGGAG Ala Cys Glu Cys His	1723	Tyr His Ala Met Ala Glu Asp Asp Glu Asp Gly Ala Pro Ala Glu 100 105 110	
(2) SEQ ID No: 21 に関する情報		Ara Ara Leu Glu Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Ser Val	
(1) 配列の特性		Glu Arg Asp Arg Ala Leu Glu His Glu Glu Pro His Trp Lys Glu Phe	
(A) 長さ: 402 アミノ酸	115	120 125	
(B) 程度: 7ミノ酸	130		
(C) 形状: 直鎖	135	140	
(D) 分子の種類: タンパク質	145	150 155	160
(E) 特性:	165	170	175
(F) その他の情報: /product = "hOP2-PP"	180	185	190
(xi) 配列の識別名: SEQ ID NO: 21			
Met Thr Ala Leu Pro Glu Pro Leu Trp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Cys 1 5 10 15			
Ala Leu Glu Glu Glu Glu Pro Glu Leu Arg Pro Pro Glu Cys Pro 20 25 30			

持表平6-506360 (37)

Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys Trp Leu Leu 195 200 205	Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val Pro Lys Ala Cys Ala 355 360 365
Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Glu Asp 210 215 220	Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Asp Ser Ser Asn 370 375 380
Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Cys Arg Ala 225 230 235 240	Asn Val Ile Leu Asp Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly 385 390 395 400
Pro Arg Ser Gin Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Pro 245 250 255	Cys His
Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Cys 260 265 270	(2) SEQ ID No: 22 に関する情報
Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Glu Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile 275 280 285	(i) 配列の特性
Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Cys Arg Arg His 290 295 300	(A) 長さ: 1926塩基対
Gly Leu Tyr Val Ser Phe Glu Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile 305 310 315 320	(B) 種類: 単鎖
Ala Pro Gin Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Cys Ser Phe 325 330 335	(C) 量: 単純
Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Glu Ser 340 345 350	(D) 形状: 直線
	(ii) 分子の種類: cDNA
	(vi) 起源
	(A) 生物: 未定名の動物
	(F) 基因: 未定
	(ix) 特徴:
	(A) 名称/キー: CDS
	(E) 場所: 93...1289
	(D) その他の情報: "polypeptide mOP2 cDNA"
	(xi) 配列の略名: SEQ ID NO: 22
	GGCAACGAGCT ACCAGCTGGAT CGCCCGCCGGG TGAAGCTCCG AG ATG CCT ATG CGT 104 Met Ala Met Arg !
CCC GGG CCA CTC TCG CTA ITG GGC CTT GCT CTG TGC GCG CTG GGA GGC 152 Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly 5 10 15 20	Tee Val Met Ser Phe Val Asn Met Val Cys Arg Asp Asn Thr Leu Gly 105 110 115
GGC CAC GGT CGG CGT CCC CGG CAC ACC TGT CCC CAG CGT CGG CTG GGA 200 Gly His Gly Pro Asp Pro Pro His Thr Cys Pro Glu Arg Arg Leu Gly 25 30 35	TAC CAG GAG CCA CAC TCG AAG GAA TTC CAC TIT GAC CTA ACC CAG ATC 488 Tyr Glu Glu Pro His Trp Lys Glu Phe His Phe Asp Leu Thr Glu Ile 120 125 130
GGG CGC GAG CGC CGC GAC ATG CAG CGT GAA ATC CTG GCG CTG GGS 248 Ala Arg Glu Arg Arg Asp Met Glu Arg Glu Ile Leu Pro Val Leu Gly 40 45 50	CCT GCT CGG GAG GCT GTC ACA GCT GCT GAG TIC CGG ATC TAC AAA GAA 536 Pro Ala Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Glu 135 140 145
CTA CGG GGA CGG CGG CGA CCC CGT GCA CAA CCC CGG CCT GCC CGG CAG 296 Leu Pro Gly Arg Pro Asp Ala Glu Pro Ala Ala Arg Glu 55 60 65	CCC ACC ACC CAC CGG CTC AAC ACA ACC CTC CAC ATC ACC ATC TTC GAA 584 Pro Ser Thr His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met Phe Glu 150 155 160
CCA CGG TCC CGG CCC CGT TCC ATG TTG GAC CTA TAC CAC GCC ATG ACC 344 Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Thr 70 75 80	GTC GTC CAA GAG CAC TCC AAC AGG GAG TCT GAC TTC TTT TTG GAT 632 Val Val Glu Glu His Ser Asn Thr Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp 165 170 175 180
GAT GAC GAC GAC CGC CGG CCA CCA CAG GCT CAC TTA CGG CGT CGG GAC 392 Asp Asp Asp Asp Gly Gly Pro Pro Glu Ala His Leu Gly Arg Ala Asp 85 90 95 100	CTT CAG ACC CTC CGA TCT CGG GAC GAG GCG TGG CTG GTC CTC GAC ATC 680 Leu Glu Thr Leu Arg Ser Glu Asp Glu-Gly Trp Leu Val Leu Ile 185 190 195
CTG CTC ATG AGC TTC GTC AAC ATG GTG GAA CGG CGC CGT ACC CTG GGC 440	ACA GCA CGC AGT GAC CGA TGG CTG CTC AAC CAT CAC AAG GAC CTG GGA 728 Thr Ala Ala Ser Asp Arg Trp Leu Leu Asn His His Lys Asp Leu Gly 200 205 210

GGCAACGAGCT ACCAGCTGGAT CGCCCGCCGGG TGAAGCTCCG AG ATG CCT ATG CGT 50

CCC GGG CCA CTC TCG CTA ITG GGC CTT GCT CTG TGC GCG CTG GGA GGC 152 Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly 5 10 15 20	Tee Val Met Ser Phe Val Asn Met Val Cys Arg Asp Asn Thr Leu Gly 105 110 115
GGC CAC GGT CGG CGT CCC CGG CAC ACC TGT CCC CAG CGT CGG CTG GGA 200 Gly His Gly Pro Asp Pro Pro His Thr Cys Pro Glu Arg Arg Leu Gly 25 30 35	TAC CAG GAG CCA CAC TCG AAG GAA TTC CAC TIT GAC CTA ACC CAG ATC 488 Tyr Glu Glu Pro His Trp Lys Glu Phe His Phe Asp Leu Thr Glu Ile 120 125 130
GGG CGC GAG CGC CGC GAC ATG CAG CGT GAA ATC CTG GCG CTG GGS 248 Ala Arg Glu Arg Arg Asp Met Glu Arg Glu Ile Leu Pro Val Leu Gly 40 45 50	CCT GCT CGG GAG GCT GTC ACA GCT GCT GAG TIC CGG ATC TAC AAA GAA 536 Pro Ala Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Glu 135 140 145
CTA CGG GGA CGG CGG CGA CCC CGT GCA CAA CCC CGG CCT GCC CGG CAG 296 Leu Pro Gly Arg Pro Asp Ala Glu Pro Ala Ala Arg Glu 55 60 65	CCC ACC ACC CAC CGG CTC AAC ACA ACC CTC CAC ATC ACC ATC TTC GAA 584 Pro Ser Thr His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met Phe Glu 150 155 160
CCA CGG TCC CGG CCC CGT TCC ATG TTG GAC CTA TAC CAC GCC ATG ACC 344 Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Thr 70 75 80	GTC GTC CAA GAG CAC TCC AAC AGG GAG TCT GAC TTC TTT TTG GAT 632 Val Val Glu Glu His Ser Asn Thr Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp 165 170 175 180
GAT GAC GAC GAC CGC CGG CCA CCA CAG GCT CAC TTA CGG CGT CGG GAC 392 Asp Asp Asp Asp Gly Gly Pro Pro Glu Ala His Leu Gly Arg Ala Asp 85 90 95 100	CTT CAG ACC CTC CGA TCT CGG GAC GAG GCG TGG CTG GTC CTC GAC ATC 680 Leu Glu Thr Leu Arg Ser Glu Asp Glu-Gly Trp Leu Val Leu Ile 185 190 195
CTG CTC ATG AGC TTC GTC AAC ATG GTG GAA CGG CGC CGT ACC CTG GGC 440	ACA GCA CGC AGT GAC CGA TGG CTG CTC AAC CAT CAC AAG GAC CTG GGA 728 Thr Ala Ala Ser Asp Arg Trp Leu Leu Asn His His Lys Asp Leu Gly 200 205 210

特表平6-506360 (38)

CCT CCT GGT CTG CTT CGA CGA CAA GCA CGC TCC AGA CAG CCT TTC Leu Ile Ile Leu Leu Gly Arg Glu Ala Pro Arg Ser Arg Glu Pro Phe 230 235 240	824	GCC ACC AAC CAT GGC ATC TTG CAG TCT CTG CTG CAC CTC ATG AAC CGA Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Glu Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro 345 350 355	1160
ATG GTA ACC TTC AGC AGG CCC AGT CCT GTG CGG CGC CCT CGG Met Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Glu Ser Pro Val Arg Ala Pro Arg 245 250 255 260	872	GAT GTT GTC CCC AAG GCA TCC TGT GCA CGC ACC AAA CTC ATG AGT CGC ACC Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr 350 365 370	1208
GCA CGG AGA CGA CGA CGT AGG AGG CAG CCA AGG AAA AGC AAC GAG CTT Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Glu Pro Lys Thr Asn Glu Leu 265 270 275	920	TCT GTG CTG TAC TAT GAC AGC AGC AAC ATT GTC ATC CTG CGT AAA CAC Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His 375 380 385	1256
CGG CAC CGG AAC AAA CTC CCA CGG ATC TTT GAT GAT GGC CAC GGT TCC Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Glu Ile Phe Asp Asp Glu His Glu Ser 280 285 290	958	CCT AAC ATC CTG GTC AAG CGC TCT GGC TCC CAC TGAGGGCGG CGCAGCTCC 1309 Asn Asn Met Val Val Lys Ile Cys Glu Cys His	
CGG CGC AGA GAG GTT TCC CGG AGC CAT GAG CTC TAC GTC AGC ATT CGT Arg Glu Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg 295 300 305	1016	TCTCTACTT ACCCTTACCAT CTGGGGCGG CGCTCTCCAG AGGGAGAAC CCTTCTATGT 1359 TATCATAGCT CAGACAGGGG CGATGGGAGG CGCTTCACTT CGCGTGGCCA CTTCCTGATA 1420	
GAC CTT CGG TCG CTG GAC TGG GTC ATC GCC CGG CGC TAC TCT GCC Asp Leu Glu Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Glu Glu Tyr Ser Ala 310 315 320	1064	AAATTCGGT CTTCGGGAGT TCCCTCTGTCG TICATGGGGT TTOCGGGCTA TCACCCCCGG 1489 CTCTCCATCC TCCCTACCCA AGCATAGACT GAATGCCAC ACCATCCCG AGCTATGGTA 1549	
TAT TAC TGT GAG GGG GAG TGT TCC CCA CTG GAC TCC TGT ATG AAC Tyr Tyr Cys Glu Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn 325 330 335 340	1112	ACTGACAGGF CTGGGGCTAG CACTGAAGGC CGACATGAGG KAGACGATTC CTTCGGGATC 1609 CTCAGCCCCAC ATGGGAAAT TCTGGATGGT CTAAAGAAGCC CGCTGGAAATT TAAACTAGAT 1663	
GATCTGGCT CTCTGGACCA TCTATTGCG CAGTGGGAC ATTCTTACGT ATAACAGACA 1729			

CATACACTTA GATCAATGCA TCGCTGTACT CCITGAAATC AGAGCTTACCT TGTGAGAAAA 1789	Val Leu Glu Leu Pro Glu Arg Pro Arg Ala Glu Pro Ala Ala
AGAATCAGAG CGACGTATAGC CGTGCGATCTT CTATTAACCC AGGCTTAAG AGACAGAGAC 1843	50 55 60 65
AGGAGAAATCT CTGIGACTTC AAGGCCACAT ASAAAGAGCC TGTCTCGGA CGAGGAAAAA 1909	Ala Arg Glu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr His Ala
AAAAAAAAGC GGAATTTC	70 75 80
(2) SEQ ID No : 23 に関する情報	
(I) 配列の特性	
(A) 長さ： 399 アミノ酸	
(B) 様類： アミノ酸	
(C) 形状： 直線	
(II) 分子の種類： タンパク質	
(ia) 特徴：	
(ib) その他の情報： /product = "mOP2-PP"	
(ii) 配列の識別名： SEQ ID NO : 23:	
Met Ala Met Arg Pro Glu Pro Leu Trp Leu Leu Glu Leu Ala Cys 1 5 10 15	Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val Glu Arg Asp Arg Thr 85 90 95
Ala Leu Glu Glu Glu His Glu Pro Arg Pro Pro His Thr Cys Pro Glu 20 25 30	100 105 110
Arg Arg Leu Glu Ala Arg Glu Arg Arg Asp Met Glu Arg Glu Ile Leu Ala 35 40 45	Leu Glu Tyr Glu Glu Pro His Trp Lys Glu Phe His Phe Asp Leu Thr 115 120 125 130

Gl Glu Pro Ser Thr His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met 135 140 145	Gl Glu Val Val Glu Glu His Ser Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe 150 155 160
Lys Glu Pro Ser Thr His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met 165 170 175	Leu Asp Leu Glu Thr Leu Arg Ser Glu Asp Glu Glu Trp Leu Val Leu 180 185 190
Asp Ile Thr Ala Ala Ser Ile Asp Arg Trp Leu Asn His Ile Lys Asp 195 200 205 210	Asp Ile Thr Ala Ala Ser Ile Asp Arg Trp Leu Asn His Ile Lys Asp 195 200 205 210

待表平6-506360 (39)

Lys Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Ala Asp Gly His Ser Met Asp		Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg			
215	220	225	375	380	385
Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Arg Glu Ala Pro Pro Arg Ser Arg Glu		Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His			
230	235	240	390	395	
Pro Phe Met Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Glu Ser Pro Val Arg Ala					
245	250	255			
Pro Arg Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Glu Pro Lys Lys Thr Asn					
260	265	270			
Gly Leu Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Gly His					
275	280	285	290		
Gly Ser Arg Gly Arg Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser					
295	300	305			
Phe Arg Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Glu Cys Tyr					
310	315	320			
Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys					
325	330	335			
Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Glu Ser Leu Val His Leu Met					
340	345	350			
Lys Pro Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser					
355	360	365	370		

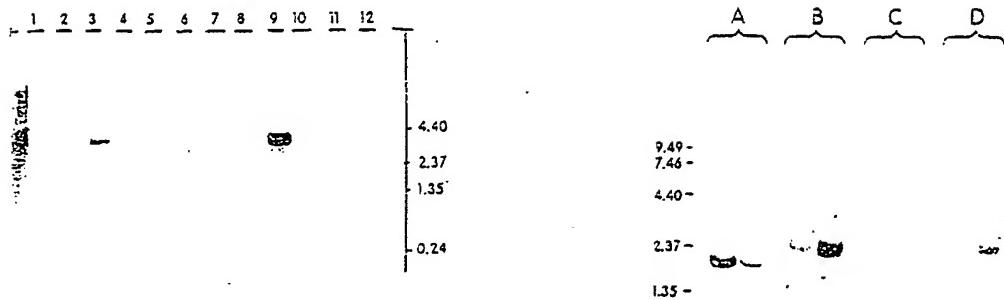


Fig. 1

1 2 1 2 1 2 1 2

Fig. 2

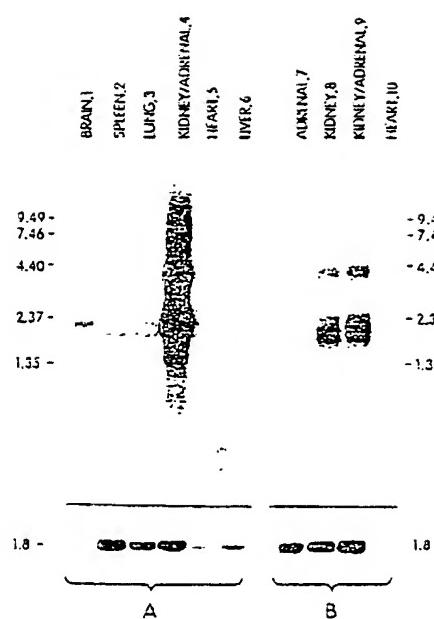


Fig. 3



Fig. 4A

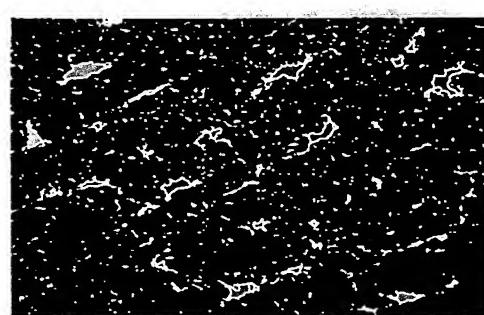


Fig. 4B



Fig. 5A

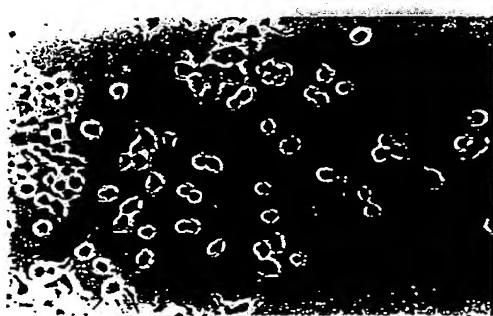


Fig. 5B

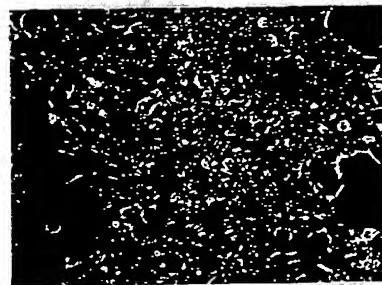


Fig. 6A

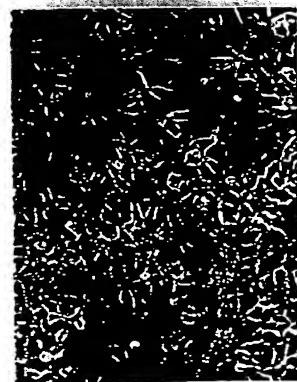


Fig. 6B

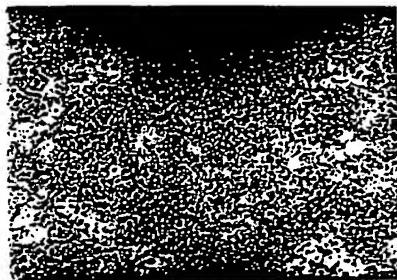


Fig. 6C



Fig. 6D



Fig. 7

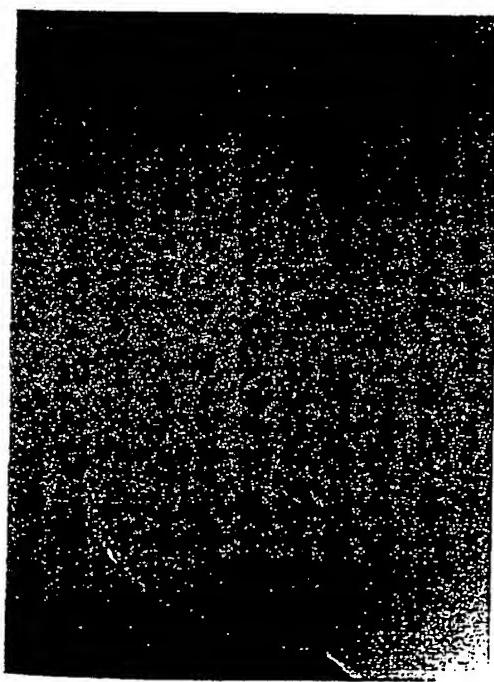


Fig. 8A



Fig. 8B

平成5年9月10日

特許庁長官 幸生 淳

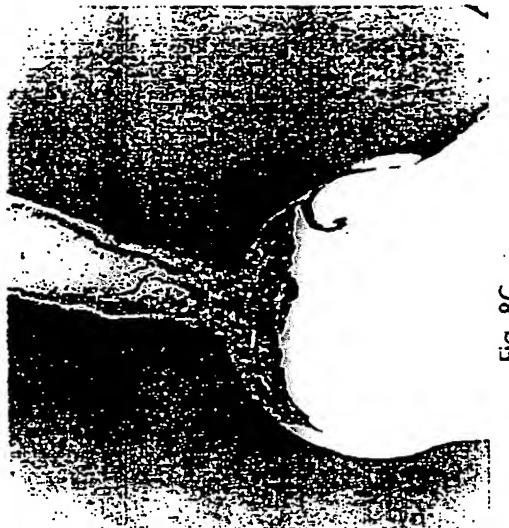


Fig. 8C

1. 特許出願の表示 PCT/US92/01968

2. 発明の名称 タンパク質により誘導される形態形成

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 01748 マサチューセッツ、ボストン、
サウス ストリート 35
名前 クリニコティップ バイオモレキュルズ インコーポレイテッド
国籍 アメリカ合衆国

4. 代理人

住所 東京都千代田区麹町5丁目4番
クロスサイド麹町ビル7階
郵便番号102 電話3288-2791~2792
氏名 (9094)弁理士 屋野清也

5. 補正書の提出年月日 1992年10月9日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通

英文明細書第113頁第5行から同頁第31行
(明細書翻訳文第143頁下から2行から第144頁第17行)

6. 哺乳動物の組織局所に非軟骨形成性の置換組織の形成を誘導するための組成物であって、形態形成を許容する組織特異な環境を提供することができる、生体適合性のある非細胞マトリックスと、前記マトリックス上に吸収させ、置換組織を必要とする組織特異の局所に与えたとき、前記局所に選択的発達の促進段階をたどる組織形態形成を誘導することができるようなモルフォゲンを含むもの。
7. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが体内で分解され得るものである組成物。
8. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが器官特異の組織から作られたものである組成物。
9. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが、コラーゲンおよびグリコサミノグリカン類およびプロテオグリカン類からなるグループから選ばれる細胞付着因子群を含むもの。
10. 請求項5または6の組成物であって、前記マトリックスが前記哺乳動物の体から移動してくる始源細胞群の付着、分化および増殖を許容する構造を持つもの。

英文明細書第116頁第8行から第117頁第28行
(明細書翻訳文第146頁第18行から第148頁第10行)

22. 請求項21の方法であって、前記非軟骨形成組織が肝組織であり、前記組織局所が肝臓である方法。
23. 請求項22の方法であって、前記プロテインが生体適合性のある非細胞性のマトリックスとともに前記局所に与えられる方法。
24. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが前記組織に特異性のある成分群を含むものである方法。
25. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが体内で分解され得るものである方法。
26. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが器官特異の組織から作られるものである方法。
27. 請求項23の方法であって、前記マトリックスがコラーゲンおよび前記組織に特異の細胞付着因子群を含む方法。
28. 請求項23の方法であって、前記マトリックスが前記哺乳動物の体から移動してくる始源細胞群の付着、分化および増殖を許容する構造を持つもの。
29. 請求項15、17、19または21の方法であって、前記モルフォゲンがhOP1 (Seq. ID No. 5)、mOP1 (Seq. ID No. 6)、hOP2 (Seq. ID No. 7)、mOP2 (Seq. ID No. 8)、CBMP2A (f*) (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (f*) (Seq.

特表平6-506360 (43)

英文明細書第119/A頁第1行から第119/C頁第25行
(明細書翻訳文第150頁末行から請求の範囲を追加)

ID No. 10)、DPP (fx)(Seq. ID No. 11)、Vg1 (fx)(Seq. ID No. 12)、Vgr-1 (fx) (Seq. ID No. 13) および GDF-1 (fx)(Seq. ID No. 14) から成るグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相同意が有るアミノ酸配列を含むものである方法。

30. 哺乳動物の肝臓の損傷組織局所に肝組織の形成を誘導する方法であって、

少なくとも DOP-1 (Seq. ID No. 5) のアミノ酸残基 43-139 を含むモルフォゲンの治療量を前記局所に与えることを含む方法。

31. ヒトの組織の機能不全を診断するする方法であって、次のステップ

(a) ヒトの中に存在する内在性の抗-モルフォゲン抗体の濃度を検出するステップを、1つの時間間隔で繰り返すこと、

(b) 前記検出された濃度を比較すること、検出された濃度の変化が前記組織の状態を示す、
を含む方法。

32. 組織の状態を評価する方法であって、前記組織中に存在するモルフォゲンの濃度を検出するステップを含む方法。

45. 請求項 35、36、37、38 または 41 のモルフォゲンであって、一般配列 1、2、3 または 4 (Seq. ID No. 1、2、3 または 4) で決められるアミノ酸配列を含むもの。

47. 請求項 42、43、44 または 45 の治療策であって、一般配列 1、2、3 または 4 (Seq. ID No. 1、2、3 または 4) で決められるアミノ酸配列を含むもの。

46. Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 43-149 から構成されるアミノ酸配列を含む、請求項 35、36、37、38 または 41 のモルフォゲン。

47. 請求項 46 のモルフォゲンであって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 38-139 によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

48. 請求項 47 のモルフォゲンであって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 1-139 によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

49. 請求項 35、36、37、38 または 41 のモルフォゲンであって、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基 6-101、Seq. ID No. 10 (CBMP-2B) の残基 5-101、Seq. ID No.

53. 請求項 52 のモルフォゲンであって、前記モルフォゲンが Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 1-139 によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

54. 請求項 42、43、44 または 45 の治療策であって、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基 6-101、Seq. ID No. 10 (CBMP-2B) の残基 6-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基 6-102、Seq. ID No. 12 (Vg1) の残基 6-102、Seq. ID No. 13 (Vgr-1) の残基 6-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基 6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

55. 請求項 54 のモルフォゲンであって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基 1-101、Seq. ID No. 10 (CBMP-2B) の残基 1-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基 6-102、Seq. ID No. 12 (Vg1) の残基 6-102、Seq. ID No. 13 (Vgr-1) の残基 6-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基 6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

D No. 11 (DPP) の残基 6-102、Seq. ID No. 12 (Vg1) の残基 6-102、Seq. ID No. 13 (Vgr-1) の残基 6-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基 6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

50. 請求項 49 のモルフォゲンであって、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基 1-101、Seq. ID No. 10 (CBMP-2B) の残基 1-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基 1-102、Seq. ID No. 12 (Vg1) の残基 1-102、Seq. ID No. 13 (Vgr-1) の残基 1-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基 1-102 およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

51. 請求項 42、43、44 または 45 の治療策であって、前記モルフォゲンが Seq. ID No. 5、6、7 または 8 (DOP-1 または DOP-2) の残基 43-139 によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

52. 請求項 51 のモルフォゲンであって、前記モルフォゲンが Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 38-139 によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

特表平6-506360(44)

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の8)

平成5年9月10日

特許庁長官 麻生 清 職

1. 特許出願の表示 PCT/US92/01969

2. 発明の名称 タンパク質により誘導される形態形成

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 01748 マサチューセッツ、ボストン
サウス・ストリート 35
名 称 クリニイティップ バイオモレキュルズ インコーポレイテッド
国 種 アメリカ合衆国

4. 代理人

住所 東京都千代田区信町5丁目4番
クロスサイド信町ビル7階
郵便番号102 電話3288-2791-2792
氏名 (9094)弁理士 鹿野清也

5. 補正書の提出年月日 1993年3月9日

6.添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)



1通

15. 始原細胞群の増殖を刺激するのに十分なある濃度とある時間、始原細胞群をモルフォゲンと接触させるステップを含むことからなる、始原細胞群個体数を増加させる方法。

英文明細書第114頁第1行から同頁第34行

(明細書翻訳文第144頁第18行から第145頁第18行)

11. 請求項1、2、5または6の組成物であって、前記モルフォゲンが、hOP1(Seq. ID No. 5)、mOP1(Seq. ID No. 6)、hOP2(Seq. ID No. 7)；mOP2(Seq. ID No. 8)、CBMP2A(fx)(Seq. ID No. 9)、CBMP2B(fx)(Seq. ID No. 10)、DPP(fx)(Seq. ID No. 11)、Vgr1(fx)(Seq. ID No. 12)、Vgr-1(fx)(Seq. ID No. 13)およびGDF-1(fx)(Seq. ID No. 14)からなるグループから選ばれた配列の1つと少なくとも70%の相同意があるアミノ酸配列を含むもの。

12. 請求項11の組成物であって、前記モルフォゲンが、前記グループから選ばれた配列の1つと少なくとも80%の相同意のあるアミノ酸配列を含むもの。

13. 請求項12の組成物であって、前記モルフォゲンがSeq. ID No. 5(hOP1)の残基43-139の配列と60%よりも大きい同一性があるアミノ酸配列を含むもの。

14. 請求項13の組成物であって、前記モルフォゲンがSeq. ID No. 5(hOP1)の残基43-139の配列と65%より大きい同一性があるアミノ酸配列を含むもの。

英文明細書第118頁第7行から第119頁第29行

(明細書翻訳文第148頁第17行から第150頁第7行)

34. 請求項33の方法であって、前記モルフォゲンがhOP1(Seq. ID No. 5)；mOP1(Seq. ID No. 6)；hOP2(Seq. ID No. 7)；mOP2(Seq. ID No. 8)；CBMP2A(fx)(Seq. ID No. 9)；CBMP2B(fx)(Seq. ID No. 10)；DPP(fx)(Seq. ID No. 11)；Vgr1(fx)(Seq. ID No. 12)；Vgr-1(fx)(Seq. ID No. 13)；およびGDF1(fx)(Seq. ID No. 14)で構成されるグループから選ばれたものである方法。

35. 非致骨形成性の哺乳動物の組織の成長の誘導において用いる医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

36. 体外で始原細胞の増殖の供給体として使用する医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

37. 哺乳動物の静止または老衰した分化細胞群の表現型の維持に用いる医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

38. 肝組織の成長の誘導に用いる医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

39. 請求項35、36、37または38の使用であって、前記モルフォゲンが、hOP1(Seq. ID No. 5)；mOP1(Seq. ID No. 6)；

英文明細書第119/4頁第1行から第119/C頁第26行

(明細書標記文第150頁末行から請求の範囲を追加)

hOP2 (Seq. ID No. 7)、mOP2 (Seq. ID No. 8)、CBMP2A (fx) (Seq. ID No. 9)、CBMP2B (fx) (Seq. ID No. 10)、DPP (fx) (Seq. ID No. 11)、Vgr1 (fx) (Seq. ID No. 12)、Vgr1 (fx) (Seq. ID No. 13) および GDF1 (fx) (Seq. ID No. 14) から成るグループから選ばれた配列の：つと少なくとも 70% の相同性を有するアミノ酸配列を含むもの。

40. 請求項 39 の使用であって、前記モルフォゲンが、前記グループから選ばれた配列の：つと少なくとも 80% の相同性を有するアミノ酸配列を含むもの。

41. 離瘻細胞の成長を抑制するための医薬品の製造のためのモルフォゲンの使用。

42. 痘の治療薬の製造のためのモルフォゲンの使用。

43. 非嵌合形性の組織の成長を誘導する治療薬の製造のためのモルフォゲンの使用。

44. 停止または老衰した分化細胞群の表現型の発現を誘導する治療薬の製造のためのモルフォゲンの使用。

45. 体外で始済細胞の増殖を誘導する治療薬の製造のためのモルフォゲンの使用。

46. 請求項 35、36、37、38 または 41 の使用であって、前記モルフォゲンが、一般配列 1、2、3 または 4 (Seq. ID No. 1、2、3 または 4) で決められるアミノ酸配列を含むもの。

47. 請求項 42、43、44 または 45 の使用であって、前記モルフォゲンが、一般配列 1、2、3 または 4 (Seq. ID No. 1、2、3 または 4) で決められるアミノ酸配列を含むもの。

48. 請求項 35、36、37、38 または 41 の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 43-139 によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

49. 請求項 45 の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 38-139 によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

50. 請求項 47 の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 1-139 によって構成されるアミノ酸配列またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

51. 請求項 35、36、37、38 または 41 の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No.

9 (CBMP-2A) の残基 6-101、Seq. ID No. 10 (CBMP2B) の残基 6-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基 6-102、Seq. ID No. 12 (Vgr1) の残基 6-102、Seq. ID No. 13 (Vgr1-1) の残基 6-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基 6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

52. 請求項 51 の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基 1-101、Seq. ID No. 10 (CBMP2B) の残基 1-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基 1-102、Seq. ID No. 12 (Vgr1) の残基 1-102、Seq. ID No. 13 (Vgr1-1) の残基 1-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基 1-102 およびその対立異形、種異形および突然変異形から選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

53. 請求項 42、43、44 または 45 の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7 または 8 (OP-1 または OP-2) の残基 43-139 によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

54. 請求項 53 の使用であって、前記モルフォゲンが Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 33-139 によって決められるアミノ酸配列、またはその

対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

55. 請求項 54 の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 5、6、7 または 8 の残基 1-139 によって決められるアミノ酸配列、またはその対立異形、種異形および突然変異形を含むもの。

56. 請求項 42、43、44 または 45 の使用であって、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基 6-101、Seq. ID No. 10 (CBMP2B) の残基 5-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基 6-102、Seq.

ID No. 12 (Vgr1) の残基 6-102、Seq. ID No. 13 (Vgr1-1) の残基 6-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基 6-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

57. 請求項 56 のモルフォゲンの使用で、前記モルフォゲンが、Seq. ID No. 9 (CBMP-2A) の残基 1-101、Seq. ID No. 10 (CBMP2B) の残基 1-101、Seq. ID No. 11 (DPP) の残基 1-102、Seq. ID No. 12 (Vgr1) の残基 1-102、Seq. ID No. 13 (Vgr1-1) の残基 1-102、Seq. ID No. 14 (GDF-1) の残基 1-102、およびその対立異形、種異形および突然変異形からなるグループから選ばれたアミノ酸配列を含むもの。

国際検査報告書		
International Application No. PCT/US91/01940		
Classification of Subject Matter of International Application		
According to International Patent Classification IPC or to both Japanese Classification and IPC		
IPC (91): A61D 17/10, A61P 3/02, C08F 11/00 日本 (91): 4601, 4602, 4603, 4604/02, 4605/02, 4606/02		
Priority Date (91): 19/09/1990		
Minimum Documentation Required*		
Classification Number Classification Symbol		
U.S.	350/150, 402, 420/423, 426, 429/260, 243	
Documentation Required other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Files Excluded*		
CHEMICAL ABSTRACTS, APS		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**		
Category	Classification of Document, ¹³ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁴	Reference to Class No. ¹⁵
S/Y	NO. A. 89/09789 (KUPERLASSAMFATH ET AL.) 19 OCTOBER 1990, see entire document.	1/3-45
S/Y	NO. A. 89/09787 (KUPERLASSAMFATH ET AL.) 19 OCTOBER 1990, see entire document.	1/3-45
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ¹⁶	Date of Making of the International Search Report ¹⁷	
12 June 1992	23 JUN 1992	
International Searching Authority ¹⁸	Examiner of International Search ¹⁹	
ISA/US	JAMES FETTER	

Form PCT/ISA/210 (second edition) 1986/6

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁸ 識別記号 場内整理番号 F I
 C 0 7 K 13/00 Z NA 8318-4H
 15/12
 C 12 N 15/12 Z NA
 G 01 N 33/53 Y 8310-2J
 // C 12 P 21/02 C 8214-4B

(72) 発明者 クベラサムバス, サンゲーベル
 アメリカ合衆国 02053 マサチューセッツ, メドウェイ, スプリング ストリート
 6
 (72) 発明者 バング, ロイ エッチ, エル.
 アメリカ合衆国 02053 マサチューセッツ, メドウェイ, キンバリー ドライブ
 16

(72) 発明者 オバーマン, ハーマン
 アメリカ合衆国 02053 マサチューセッツ, メドウェイ, サマー ヒル ロード
 25
 (72) 発明者 ルーガー, ディヴィッド シー.
 アメリカ合衆国 01748 マサチューセッツ, ホブキンソン, ダウネイ ストリート
 19

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成12年9月12日(2000.9.12)

【公表番号】特表平6-506360

【公表日】平成6年7月21日(1994.7.21)

【年通号数】

【出願番号】特願平4-509427

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 35/12

38/00

A61P 19/00

43/00 105

C07K 14/51

C12N 5/00

5/06

5/10

// C12P 21/02

(F I)

C12N 15/00 ZNA A

A61K 35/12

A61P 19/00

43/00 105

C07K 14/51

C12P 21/02 C

C12N 5/00

B

E

A61K 37/02

手稿補正書

平成11年3月11日

新编伊川先生集

1. 事件の表示 平成1年1月1日付西暦 3 0 9 4 2 7

2. 特許をする者

アーティスト：クリニイチップ、バイオモレチャルズ、インコースティック

3. 代 四 人

地 告 所 東京都新宿区四谷1丁目2番1号
三浜ビル3階
郵便番号 160-0004 電話 3255-6871
氏名 (0001) 井原士雄 野崎 信一

1. 痘正对称性双名 牛痘苗

3. 指正対象項目名　箇条の範囲

日、地圖の位置 諸君の位置を明示する所である。

説文の歴史

1. a) 乳頭された骨芽細胞、及び

b) ヒトOP-1のC末端の7システイン骨髄、SEQ ID NO:5か
18-139残基と少なくとも70%の相同期性をもつアミノ酸配列を有する類似
モルモフ・ゲンを含み、該モルモフ・ゲンが骨形成の生体内試験において、軟骨
性骨の形成を誘導する活性。

2. 該モルモフ・ゲンが、ヒトOP-1のC末端の7システイン骨髄と少なくとも
80%の相同期性をもつアミノ酸配列を有する既存第1の活性。

3. 单離された骨芽細胞、打破、質粒、皮膚、骨髄の内腔、血、心臓、及
び及び骨組織塊からなる臍から単離された細胞を含む既存第1の活性。

4. 分化した骨芽細胞の骨格形成能を、ヒトOP-1のC末端の7システイン骨
髄、SEQ ID NO:5か18-139残基と少なくとも70%の相同期性を
もつアミノ酸配列を有するモルモフ・ゲンに接触させるとテップを含み、該モ
ルモフ・ゲンが骨芽細胞の生体内試験において軟骨性骨の形成を誘導する分化した骨
芽細胞の骨格形成能を回復させる方法。

5. 該モルモフ・ゲンが、ヒトOP-1のC末端の7システイン骨髄と少なくと
く80%の相同期性をもつアミノ酸配列を有する既存第4の方法。

6. 除非行骨頭丸、肝臓、脾臓、皮膚、骨髄の内腔、血、心臓、血管及び神經
組織からなる臍から単離された細胞を含む既存第4の方法。

7. 制度されて増殖するに十分な濃度と時間、生体外でモルフ・ゲンに曝され
制御された骨芽細胞の始動活性を含み、培養生細胞培地の組成を増加させる範
囲。

8. 骨芽細胞の組成因子で軟骨骨頭丸の形成を抑制する物質であって、
組成に特異的な成分を含み、骨形態形成を有する組成物質を発現するこ
とができる生細胞因子である骨細胞のマトリックスと、該マトリックス上で吸収

され、直角性を必要とする複数個の角柱状特徴が局所にあてがわれたところ、該局所に衣表の外見形態をたどる延び形態選択を説明することができるようモルフィガントを含む組成物。

9. 布地表面が拘束されて伸展するのに十分な強度と時間、該表面を生体外でもモルフィガントに適応させるステップを含む、哺乳動物の出生部位の筋肉生体外で初期化する方法。

10. 布地中のモルフィガント浓度を検出、比較し、検出された位置度の変化が該布地の形状を維持するためのモルフィガントの使用。

11. a) 例へば組織、または歯の組織のような柔軟堅物の分岐管網の生成を説明する、または

b) 生体内または生体外で哺乳動物の幹細胞培養の増殖を説明する、または

c) 哺乳動物の分化したまたは休息した分化細胞の表現型を維持しあたは回復させる。

ための医療的治療へのモルフィガントの使用。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.